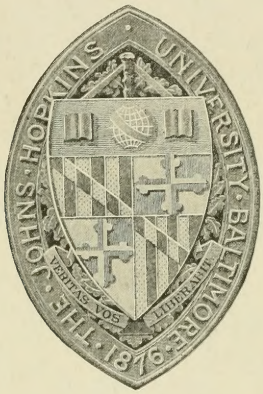
XM
.E6366
V.1-2

LIBRARY

OF THE

JOHNS HOPKINS UNIVERSITY



PRESENTED BY

Prof. H. S. Jennings

DISPOSED OF BY THE LIBRARY
THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY

LIBRARY
THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN
BRONX PARK, NEW YORK 10458

MEMORIAS

DO

Rio de Janeiro.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TOMO I

COM 13 ESTAMPAS E 22 FIGURAS NO TEXTO

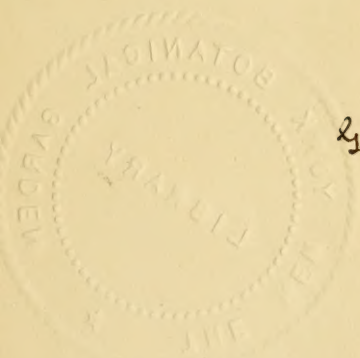
RIO DE JANEIRO - MANGUINHOS

1909

B

XM
E6366
V.1-2

Biol



Gift of Prof. N. J. Fenning
Jan. 6, 1921

INDICE

FACICULO I

GIEMSA (G.) e GODOY (A.) — **Sobre a ultrafiltração. Pesquizas tendentes a obter a concentração do sôro antidifterico** (1 figura no texto) 3
Drs. ADOLPHO LUTZ e ARTHUR NEIVA — Erephopsis auricincta. Uma nova mutuca, da subfamilia: *Pangoninae* (Estampa 1) 12
Dr. FIGUEIREDO VASCONCELLOS — **O sôro anti-pestozo** 14
Drs. ADOLPHO LUTZ e ARTHUR NEIVA — **Contribuições para o conhecimento da fauna indijena de Tabanidas** 28
Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Sobre a Amoeba diplomitotica n. sp.** Contribuição para o estudo da divizão nuclear nas amebas (Estampa 2) 33
Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e ARTHUR NEIVA — **Contribuição para o estudo dos parazitas intra-globulares dos lacertidas.** *Plasmodium diploglossi* n. sp. *Plasmodium tropiduri* n. sp. (Estampa 3) . 44
Dr. A. FONTES — **Estudos sobre a tuberculoze** (2 figuras no texto) 51
Dr. ARTHUR NEIVA — **Contribuição para o estudo dos dipteros.** Observações sobre a biolojia e sistematica das anofelinas brazileiras e suas relações com o impaludismo (Estampa 4) 69

GIEMSA (G.) u. GODOY (A.) — **Ueber Filtration und Versuche, mit Hilfe derselben Diphterieserum zu konzentrieren** (1 Text-Figur) 3
Dr. ADOLPHO LUTZ u. Dr. ARTHUR NEIVA — **Erephopsis auricincta.** Eine neue Tabanidenart aus der Subfamilie: *Pangoninae* (Tafel 1) 12
Dr. FIGUEIREDO VASCONCELLOS — **Le sérum anti-pesteux.** 14
Dr. ADOLPHO LUTZ u. Dr. ARTHUR NEIVA — **Beiträge zur Kenntniss der einheimischen Tabanidenfauna** . 28
Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Ueber eine neue Amoebenart, Amoeba diplomitotica.** Beitrag zum Studium der Kernteilung bei den Amoeben (Tafel 2) 33
Drs. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO and ARTHUR NEIVA — **Two new species of Plasmodium,** *Pl. diploglossi* and *Pl. tropiduri.* A contribution to the study of the endoglobular parasites os the lizards (Plate 3) 44
Dr. A. FONTES — **Etudes sur la tuberculose** (2 Text-Figuren) 51
Dr. ARTHUR NEIVA — **Beitrag zur Kenntniss der Dipteren.** Beobachtungen über die Biologie und Systematik der brasilianischen Anophelinen und deren Beziehungen mit der Malaria (Tafel 4) 69

FACICULO II

Dr. S. von PROWAZEK — **Contribuição para o estudo do dezenvolvimento do "Spirochaeta gallinarum"** (7 figuras no texto) 79
Dr. ALCIDES GODOY — **Multiplicação dos bacterios em cultura.** I. Constante de velocidade de multiplicação 81
Dr. GOMES DE FARIA — **Echinostomum crotophagae, n. sp.** Novo parazito do anú azul, Crotophaga maior. L. (Estampa 5) 99
Dr. S. von PROWAZEK — **Duplicidade morfolojica nos infuzorios ciliados** (Estampa 6). 105
Dr. ARTHUR MOSES — **Da pesquiza de antijeno e de anticorpo pela fixação de complemento** 109
Dr. ADOLPHO LUTZ — **Contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Simulium"** . 124
Drs. S. von PROWAZEK e H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Estudos sobre a variola** (2 figuras no texto e estampas 7 e 8) 147
Dr. CARLOS CHAGAS — **Nova tripanozomiaze humana.** Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem (10 figuras no texto e estampas 9—13 159

Dr. S. von PROWAZEK — **Zur Entwicklung von "Spirochaeta gallinarum"** (7 Text-Fignren). 79
Dr. ALCIDES GODOY — **Ueber die Vermehrung der Bacterien in den Culturen.** I. Die Constante ihrer Geschwindigkeit 81
Dr. GOMES DE FARIA — **Echinostomum crotophagae, n. sp.** A new parasite of the blue anú, Crotophaga maior. L. (With plate 5) 99
Dr. S. von PROWAZEK — **Formodimorphismus bei ciliaten Infusorien** (Tafel 6) 105
Dr. ARTHUR MOSES — **Ueber den Nachweis von Antigen und Antikörper durch Komplementablenkung** . . 109
Dr. ADOLPHO LUTZ — **Beitrag zur Kenntniss der brasilianischen Simuliumarten** 124
Drs. S. von PROWAZEK und H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Variola-Untersuchungen.** (2 Text-Figuren und Tafel 7 und 8). 147
Dr. CARLOS CHAGAS — **Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen.** Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, Erreger einer neuen Krankheit des Menschen (10 Text-Figuren und Tafel 9—13) 159

TOMO I FACICULO I

MEMORIAS

DO

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RIO DE JANEIRO — MANGUINHOS

ABRIL DE 1909

SUMARIO:

I — GIEMSA (G.) e GODOY (A.) — **Sobre a ultrafiltração. Pesquizas tendentes a obter a concentração do sôro antidifterico** (1 figura no texto) 3

II — Drs. ADOLPHO LUTZ e ARTHUR NEIVA — **Erephopsis auricincta. Uma nova mutuca, da subfamilia:** *Pangoninae* (Estampa 1) 12

III — Dr. FIGUEIREDO VASCONCELLOS — **O sôro anti-pestozo** 14

IV — Drs. ADOLPHO LUTZ e ARTHUR NEIVA — **Contribuições para o conhecimento da fauna indijena de Tabanidas** 28

V — Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Sobre a Amoeba diplomitotica n. sp.** Contribuição para o estudo da divizão nuclear nas amebas (Estampa 2) 33

VI — Drs. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO e ARTHUR NEIVA — **Contribuição para o estudo dos parazitas intraglobulares dos lacertidas.** *Plasmodium diploglossi* n.sp. *Plasmodium tropiduri* n.sp. (Est. 3) 44

VII — Dr. A. FONTES — **Estudos sobre a tuberculoze** (2 figuras no texto) 51

VIII — Dr. ARTHUR NEIVA — **Contribuição para o estudo dos dipteros.** Observações sobre a biolojia e sistematica das anofelinas brazileiras e suas relações com o impaludismo (Estampa 4) . . . 69

SOMMAIRE:

I — GIEMSA (G.) u. GODOY (A.) — **Ueber filtration und Versuche, mit Hilfe derselben Diphterieserum zu konzentrieren** (1 Text-Figur) 3

II — Dr. ADOLPHO LUTZ u. Dr. ARTHUR NEIVA — **Erephopsis auricincta.** Eine neue Tabanidenart aus der Subfamilie: *Pangoninae* (Tafel 1) 12

III — Dr. FIGUEIREDO VASCONCELLOS — **Le sérum anti-pesteux** 14

IV — Dr. ADOLPHO LUTZ u. Dr. ARTHUR NEIVA — **Beiträge zur Kentniss der einheimischen Tabanidenfauna** 28

V — Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Ueber eine neue Amoebenart, Amoeba diplomitotica.** Beitrag zum Studium der Kernteilung bei den Amoeben (Tafel 2) 33

VI — Drs. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO and ARTHUR NEIVA — **Two new species of Plasmodium,** *Pl. diploglossi* and *Pl. tropiduri*. A contribution to the study of the endoglobular parasites of the lizards (Plate 3) 44

VII — Dr. A. FONTES — **Etudes sur la tuberculose** (2 Text-Figuren) 51

VIII — Dr. ARTHUR NEIVA — **Beitrag zur Kentniss der Dipteren.** Beobachtungen über die Biologie und Systematik der brasilianischen Anophelinen und deren Beziehungen mit der Malaria (Tafel 4) . 69

AVIZO

As «MEMORIAS» serão publicadas em faciculos, que não aparecerão em datas fixas e que formarão volumes de mais ou menos 200 pajinas. No miniimo, aparecerá um volume por ano.

Na parte escrita em portuguez foi adotada a grafia aconselhada pela Academia de Letras do Rio de Janeiro.

Toda correspondencia relativa ás «MEMORIAS» deverá ser dirijida ao **"Diretor do Instituto Oswaldo Cruz - Caixa postal 926 - Manguinhos - Rio de Janeiro".**

AVIS

Les «MEMOIRES» seront publiés par fascicules qui ne paraitront pas en epoques determinées et qui formeront des volumes d'a peu près 200 pages. Il paraitra chaque année, au moins, un volume.

La partie portugaise est écrite selon la graphie adoptée par l'Académie de Lettres de Rio de Janeiro.

Toute correspondance doit être adressée au **"Directeur de l'Institut Oswaldo Cruz — Caisse postale 926 - Manguinhos - Rio de Janeiro".**

Sobre a ultrafiltração. Pesquizas tendentes a obter a concentração do sôro antidifterico

pelos Drs.

G. Giemsa e A. Godoy

Ueber Filtration und Versuche, mit Hilfe derselben Diphtherieserum zu konzentrieren

von

G. Giemsa und A. Godoy

A filtração de coloides dissolvidos atravez de gelatina de que se ocuparam já Martin, Bechholds, Malfitano, e Duclaux, tem adquirido, especialmente depois dos interessantes trabalhos de Bechholds, extraordinaria importancia.

De notavel valor são as pesquizas de Bechholds, em que, com o aparelho por elle construido e chamado de ultrafiltração, mostrou pela primeira vez que se podia variar a permeabilidade do filtro com modificar a concentração da geléa, e que, por filtros de diferentes permeabilidades se podia em filtrações fracionadas separar uns dos outros coloides de diferentes tamanhos de particulas. A tão promissoras perspectivas, que para a bioquimica em geral abria este metodo de filtração, já Bechholds se referiu em seu trabalho.

Será talvez de interesse lembrar aqui que no dominio da microbiolojia, notadamente no estudo dos chamados ajentes ultraviziveis, a filtração pelos gelatino-coloides já se mostrou de vantajem. Assim poderam Prowazek e Giemsa demonstrar, que pela ultrafiltração de material nativo de *Hühnerpest,* o qual como se sabe é infeciozo, mesmo na diluição de 1 : 1000 milhões, é o virus retido pelo filtro de modo a se obter sempre um filtrado com-

Die Filtration gelöster Kolloide durch Gallerte, mit welcher sich zuerst Martin (1), Malfitano (3), Borrel (3), Manca (3) und Duclaux (3) beschäftigten, hat bekanntlich durch die interessanten Arbeiten Bechholds (2) ausserordentlich an Bedeutung gewonnen.

Von besonderer Wichtigkeit sind die Versuche Bechholds, in denen er mit Hilfe eines von ihm konstruierten sog. Ultrafiltrationsapparates als Erster nachweisen konnte, dass sich die Filterdichte durch Aenderung der Gallertkonzentration beliebig variiren lässt und dass sich durch verschieden dichte Filter Kolloide verschiedener Teilchengrösse durch fraktionierte Filtrationen voneinander trennen lassen. Auf die überaus mannigfachen Perspektiven, die uns diese Filtrationsmethode für die gesamte Biochemie etc. eröffnet, hat Bechhold bereits in seinen Arbeiten hingewiesen.

Es dürfte vielleicht von Interesse sein, an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Filtration durch Kolloidgallerte auf parasitologischem Gebiete, namentlich beim Studium sogenannter ultravisibiler Erreger, bereits Vorteilhaftes geleistet hat. So konnten Prowazek und Giemsa (4) zeigen, dass es bei der Ultrafiltration von frischem Hühnerpestmaterial, das bekanntlich noch in einer Verdünnung von 1 : 1000 Millionen infektiös ist, mit absoluter Sicherheit gelingt, das Virus im Filter zurückzuhal-

pletamente inocuo; pela filtração em vela Chamberland-Pasteur isto acontece raras vezes, e pelo uzo de filtros mais grosseiros nunca se dá. O mesmo tem lugar para o cauzador da variola descrito por Prowazek e Aragão.

Requerem-se as condições seguintes para demonstração em estado puro desses microorganismos: filtrar primeiramente atravez uma vela esteril de *largos póros*, porem verificada impermeavel para as bacterias (por ex. uma vela de porcelana comum de Berkefeld), separa-se assim as bacterias existentes, podendo-se, então, supor que no filtrado só se encontra o chamado germen ultravizivel em estado de pureza, com o qual se poderá, daí por deante, proceder de modos diversos. Por processo semelhante se conseguiu, como resalta no mesmo trabalho, izolar os ajentes da variola e da *Hühnerpest* até aí desconhecidos ou ainda não diagnosticados com segurança. Aquilo que resta na ultrafiltração sobre a camada superficial de um filtro de grandes poros coberto de agar, lavado com agua fiziologica de clorureto de sodio, com o fim de separar o mais possivel a parte seroza, é finalmente tornado por esse meio sucetivel de coloração, e a cor revela nitidamente como formas muito pequenas. Indicações exatas sobre a membrana de agar aí empregada — vela de Pukal coberta com agar a 3 % — funcionando por pressão reduzida, são encontradas nos orijinais referidos.

A operação com este filtro não é sómente muito mais comoda, mas oferece notaveis vantajens sobre o aparelho de Bechholds como pudemos verificar.

Podia ser que este metodo fosse tambem utilizavel em estudos soro-biolojicos, e então, na experiencia, se conseguisse, com o emprego de filtros de diferentes graus de permeabilidade, obter o enriquecimento dos anticorpos existentes no soro antidifterico, simultaneamente com a separação dos componentes do soro sem importancia para a sua ação curativa. Como vantajens de nosso metodo de filtração pelo vacuo podemos indicar as seguintes:

ten und stets ein vollkommen unschädliches steriles Filtrat zu erhalten, während dies bekanntlich bei der Filtration durch Chamberland-Pasteur-Kerzen nur selten, bei Anwendung noch gröberer Bakterienfilter nie gelingt. Dasselbe gilt für den von Prowazek und Aragão (5) beschriebenen Erreger der Variola. Hieraus sind aber auch folgende für die Reindarstellung dieser Mikroorganismen wichtigen Schlüsse zu ziehen: Filtriert man das in einer genügenden Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Material zunächst durch ein steriles, *weitporiges*, aber bekanntermeise für Bakterien dichtes Filter, z. B. durch eine gewöhnliche Berkefeld'sche Kieselgurkerze, siebt man auf diese Weise die Bakterien gewissermassen ab, so muss man annehmen, dass man es im Filtrat nunmehr mit einer Reinkultur der sogenannten ultravisibilen Erreger zu thun hat, mit der man dann nach den verschiedensten Richtungen hin weiter operieren kann. Auf ähnliche Weise gelang es denn auch, wie aus denselben Arbeiten hervorgeht, die bis dahin unbekannten, bezw. noch nicht mit genügender Sicherheit diagnostizierten Erreger der Hühnerpest und Variola zunächst zu isolieren, sie durch Ultrafiltration auf der obersten Schicht einer weitporigen Agargallerte zurückzuhalten, durch Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung von den serösen Bestandteilen möglichst zu trennen, und sie schliesslich, nachdem sie so für die färberische Darstellung geeigneter gemacht worden waren, durch Tinktion als äusserst kleine Gebilde sehr schön zur Anschauung zu bringen. Genaue Angaben bezüglich der damals benutzten Gallertmembranen — mit 1 bezw. 3 %-igem Agar überschichtete Pukalkerzen etc. —, bei denen mit Minusdruck gearbeitet wurde, befinden sich in den betreffenden Originalien.

Da sich das Operieren mit diesen Filtern nicht nur sehr bequem gestaltete, sondern dem Arbeiten mit dem Bechhold'schen Apparat gegenüber manch andere bemerkenswerte Vorteile zu bieten schien, entschlossen wir uns, diese Methode auch serobiologischen Studien nutzbar zu machen und zwar zunächst zu versuchen, ob es gelänge, bei Anwendung ver-

1) Observámos já em pesquizas preliminares, que pelo emprego do nosso aparelho — ao menos no que se refere á filtração de soro de cavalo — não se dá separação ou gelatinização do coloide, como por exemplo, observou Bechholds na ultra-filtração de soro de coelho nem solidificação no sentido de Duclaux. Pelo nosso metodo de filtração, o soro conserva, mesmo quando pela ultrafiltração foi concentrado até a consistencia xaropóza, o estado de liquido homojeneo e o filtro possue, como resalta da aproximada igualdade do reziduo seco em cada uma das frações da filtração, do começo ao fim a mesma permeabilidade para os soroproteinas. Se esta observação rezulta unicamente do vazio regular obtido pela trompa de agua ou, mais provavelmente da diferença essencial da ação da pressão ou do vacuo, só outras pesquizas poderão decidir.
2) Nosso aparelho torna superfluo o emprego de um ajitador, porque os coloides concentrados em virtude de um maior pezo especifico decem da superficie da vela para o fundo e aí se reunem, emquanto que o filtro é sempre envolvido por soro diluido que se adiciona.
3) O trabalho pelo vacuo permite seguir exatamente com a vista todo o curso da filtração, quer no soro filtrado, quer no restante.
4) Nosso aparelho é extraordinariamente barato e facil para se preparar.

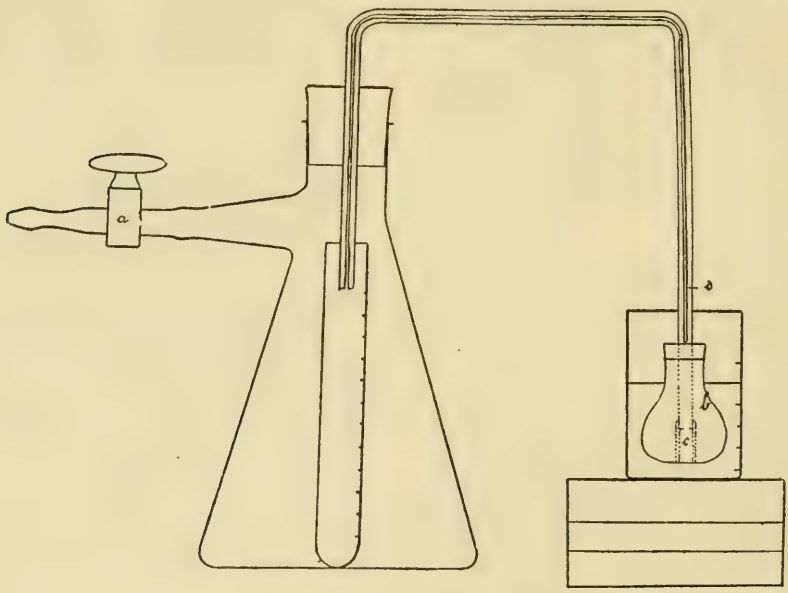
A camada de agar sobre a vela de Pukal obtem-se com facilidade; todo o aparelho não difere esencialmente do já descrito por Prowazek e Giemsa, e compreende-se sem dificuldade pelo dezenho junto. E' esterilizado no autoclave; depois de frio mergulha-se a vela 3—4 vezes em agar liquefeito e esfriado a 50°, depois, com o fim de solidificar o coloide, coloca-se a vela em um cristalizador esfriado por gelo e no fundo agua para que não seque a camada de agar. Com algum exercicio obtem-se facilmente por este modo uma ca-

schieden dichter Filter im Diphterieserum eine Anreicherung von Antikörpern zu erzielen unter gleichzeitiger Abscheidung der für die Heilwirkung irrelevanten Serumbestandteile. Die Vorteile unserer Vacuum-Filtrationsmethode glauben wir hauptsächlich in folgenden Punkten erblicken zu müssen.

1) Wie wir schon gelegentlich einiger Vorversuche beobachteten, findet bei dem Arbeiten mit unserem Apparat — wenigstens soweit es sich um die Filtration von Pferdeblutserum handelt — ein Abscheiden bezw. ein Gelatinieren des Kolloids, wie es z. B. Bechhold bei der Ultrafiltration von Kaninchenserum beobachtete, eine sog. Solidifikation im Sinne Duclaux's nicht statt. Bei unserer Filtration bewahrte das Serum, selbst wenn es bis zu Sirupdicke durch Ultrafiltration eingeengt war, stets seinen homogenen flüssigen Zustand und die Filter zeigten dementsprechend, wie aus den annähernd gleichbleibenden Trockenrückständen der einzelnen Filtratsfraktionen hervorgeht, am Anfang wie am Ende der Filtration ziemlich dieselbe Durchlässigkeit für die Serumproteine. Ob diese Beobachtung lediglich auf den mässigen, durch die Wasserstrahlluftpumpe erzielbaren Druck zurückzuführen ist, oder, was wahrscheinlicher ist, auf prinzipielle Unterschiede, die zwischen der Wirkung von Druck bezw. Minusdruck obwalten, muss späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.
2) Unser Apparat macht einen Rührer überflüssig, da das konzentrierte Kolloid des höheren spezifischen Gewichtes wegen am Kerzenrand zu Boden sinkt und sich dort ansammelt, während das Filter immer mit dem nachfliessenden dünneren Serum umspült wird.
3) Das Arbeiten im Vacuum gestattet es, den ganzen Verlauf des Filtrationsprozesses, sowohl was Filtrat, wie Rückstand anbelangt, mit dem Auge genau verfolgen zu können.
4) Unser Apparat ist ausserordentlich leicht und wohlfeil herzustellen.

mada homojenea de agar. A camada de agar comporta-se um pouco dezigualmente, segundo a sua espessura, não no que diz respeito ao tamanho dos seus póros, que é o que sómente tem importancia. Durante a formação da camada, a torneira *a* deve se conservar aberta para que o calor que transmite o agar á vela de Pukal não determine pressão alguma no aparelho e por conseguinte a formação de bolhas na camada de agar solidificado. Pequenas bolhas de ar que se formam sobre o agar, rezultantes de introdução muito rapida do filtro no coloide, podem facilmente eliminar-se pela aproximação de um fio de platina incandecente do logar em que ellas se encontram, quer a massa esteja liquida, quer já solidificada. Para se obter filtrados estereis é necessario intercalar entre o tubo que tem a torneira *a* e o tubo aspirador uma pequena bola cheia de algodão antes de se fazer a esterilização no autoclave. No tubo *b* colocase um pedaço de tubo de borracha com o fim de evitar que seja perfurado o filtro na introdução do capilar. Em lugar do filtro de Pukal pode-se, naturalmente, empregar ou-

Das Ueberschichten der Pukalzellen mit Agar wurde folgendermassen bewerkstelligt: Der ganze Apparat, der in der Hauptsache dem bereits früher von Prowazek und Giemsa (4) beschriebenen gleicht und dessen Anordnung ohne weiteres aus der beigegebenen Zeichnung ersichtlich ist, wurde zunächst im Dampftopf sterilisiert, darauf abgekühlt und die Zelle etwa bis d abwechselnd 3—4 mal bald in die flüssige, auf 50° abgekühlte Agarlösung hineingetaucht, bald behufs Erstarrens des Kolloids in einen eisgekühlten Zylinder



gebracht, dessen Boden mit Wasser bedeckt war, um das Eintrocknen der Agargallerte zu verhindern. Bei einiger Uebung lässt sich auf diese Weise leicht eine homogene Ueberschichtung erzielen. Die Gallerte fällt zwar bezüglich der Dicke der Schicht etwas ungleich aus, nicht jedoch, worauf es in erster Linie ankommt, bezüglich ihrer Porengrösse. Während des Ueberschichtens ist Hahn a zu öffnen, damit sich infolge der Wärme, die sich von der Agarlösung auf die Pukalkerze überträgt, kein Ueberdruck im Apparat und als Folge hiervon Blasen in der erstarrenden

tro como o de Berkefeld, Chamberland etc., assim tambem a forma pode ser outra qualquer, alem da reprezentada no dezenho, tal como a cilindrica. A preparação da camada de celoidina é feita do mesmo modo, somente, porem, é a propria filtração limitada em virtude da penetração de grande quantidade de agua nos póros do coloide solidificado que continha o meio dissolvente. Para a preparação da solução de agar uza-se somente agua distilada. Para o modo de se comportar durante a filtração não é indiferente empregar-se como suporte da camada de coloide que depois deve ser solidificada uma vela humida ou seca. No primeiro cazo, temos uma camada superficial; ao contrario, no segundo, em que uma camada se forma penetrando na vela, observa-se que a filtração se procede mais rapidamente não se dando a imbibição. Este fato é interessante não só teorica como praticamente. Uma camada melhor se obtem esfriando previamente a vela de Pukal em agua gelada antes de mergulhar no agar pouco quente. A gelatina, devido ao tempo para se solidificar, apropria-se pouco, ou mesmo nada, para o revestimento.

Diversas pesquizas preliminares feitas com celoidina, gelatina e agar nos mostraram que o ultimo é o que mais se apropria ao nosso fim; ao contrario da gelatina consegue-se facilmente que o agar se solidifique, mesmo quando a temperatura ambiente é alta; em contrapozição com a celoidina, no agar não é o liquido intermicelar facilmente volatil, de modo que com elle se pode obter um filtro esteril e de tamanho avaliavel de póros.

Para se fazer idéa da permeabilidade do material de filtro que uzámos, filtrámos soro de cavalo atravez de membranas de agar de diferentes grandezas de póros, assim como de celoidina, durante o tempo necessario á passajem de metade da quantidade primitiva atravez do filtro com a camada. A tabella I rezume os rezultados obtidos, e aí assinalámos os reziduos solidos na sua maioria constituidos por substancias albuminoides e o reziduo da incineração indicando os sáes inorganicos correspondentes ao soro filtrado e ao concentrado.

Agarschicht bilden. Kleine Luftbläschen, die mitunter infolge zu schnellen Eintauchens des Filters in den Agar auf der Gallerte entstehen, lassen sich leicht durch Annäherung eines glühenden Platindrahtes an die betreffenden Stellen der flüssigen oder in Erstarrung begriffenen Masse entfernen. Um sterile Filtrate zu erzielen, ist es notwendig, zwischen dem Rohr, an welchem Hahn a angebracht ist, und dem Saugschlauch eine mit Watte gefüllte Vorlage anzubringen, bevor die Sterilisation des ganzen Apparates im Dampftopf erfolgt. Am Rohr b ist ein Gummischlauch angebracht, der ein Durchstossen der Filterzelle beim Einfügen der Capillare verhindert. Anstatt der Pukalfilter kann man natürlich auch solche nach Berkefeld, Chamberland etc. benutzen, ebenso ist man durchaus nicht an die in der Zeichnung angegebene Form des Filters gebunden, sondern kann auch mit Zylindern u. dergl. arbeiten. Die Zelloidinüberschichtung geschah in ähnlicher Weise, nur wurde vor der eigentlichen Filtration das in den Poren des erstarrenden Kolloids befindliche Lösungsmittel durch Hindurchsaugen grösserer Wassermengen verdrängt. Zur Bereitung der Agarlösung diente ausschliesslich destilliertes Wasser. Für den zeitigen Verlauf der Filtration war es nicht ganz gleichgültig, ob man die Kolloidlösung, die später zur Filtergallerte erstarren sollte, auf einer feuchten oder trockenen Pukalkerze zum Gelatinieren gebracht hatte. In ersterem Falle, in welchem man es mit einem *Ueber-* anstatt mit einem *Durchschichten* der Kerze zu thun hat, beobachtet man, dass die Filtration stets schneller vonstatten geht als bei durchtränktem Pukal. Diese Tatsache ist ebenso theoretisch interessant wie praktisch bedeutsam.

Das *Ueber*schichten mit Agar gelingt am besten, wenn man die Pukalkerze vor dem Eintauchen in die mässig warme Agarlösung in Eiswasser kühlt. Gelatine eignet sich wegen ihres langsamen Erstarrens zum *Ueber*schichten wenig oder garnicht.

Verschiedene Vorversuche, die mit Cozelloidin-, Gelatine- und Agarfiltern angestellt wurden, liessen uns erkennen, dass sich letztere am besten für unsere Zwecke eigneten; im

Quadro I

Soro normal de cavalo

Filtração em	Pela filtração concentrou-se soro normal de		Reziduo seco de 10 cc. em gr.		Reziduo de incineração de 10 cc. em gr.		Côr
		Soro orijinal	0.924		0.055		amarelado
Agar 1 %	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado Filtrado $^{3}/_{10}$ Filtrado $^{8}/_{10}$	1.220	 0.641 0.639	0.072	 0.040 0.039	amarelo amarelado amarelado
Agar 3%	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado Filtrado $^{3}/_{10}$ Filtrado $^{8}/_{10}$	1.541	 0.290 0.272	0.078	 0.036 0.035	amarelo escuro quazi incolor quazi incolor
Celoidina	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado Filtrado $^{3}/_{10}$ Filtrado $^{8}/_{10}$	1.602	 0.242 0.240	0.070	 0.046 0.044	amarelo escuro incolor incolor

Quadro II

Soro antidifterico

Filtração em	Pela filtração concentrou-se		Reziduo seco de 10 cc. em gr.		Reziduo de incineração de 10 cc. em gr.		Unidades imunizantes	Côr
		Soro orijinal	0.975		0.058		150-200	amarelado
Agar 1%	300 cc. á 60 cc.	Soro concentrado Soro filtrado	2.120	 0.670	0.099	 0.042	200-300 40-80	amarelo amarelado
Agar 3%	300 cc. á 100 cc.	Soro concentrado Soro filtrado	2.340	 0.278	0.104	 0.035	400-500 menos de 10	amarelo escuro quazi incolor

Tabelle I

Normalpferdeblutserum

Filtration durch:	Es wurden vom Normalserum durch Filtration eingeengt		Trockenrückstand aus 10 cc. in g.		Glührückstand aus 10 cc. in g.		Farbe
		Originalserum	0.924		0.055		gelblich
Agar 1%	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum Filtrat $^{3}/_{10}$ Filtrat $^{8}/_{10}$	1.220	 0.641 0.639	0.072	 0.040 0.039	gelb gelblich gelblich
Agar 3%	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum Filtrat $^{3}/_{10}$ Filtrat $^{8}/_{10}$	1.541	 0.290 0.272	0.078	 0.036 0.035	tiefgelb fast farblos fast farblos
Zelloidin	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum Filtrat $^{3}/_{10}$ Filtrat $^{8}/_{10}$	1.602	 0.242 0.240	0.070	 0.046 0.044	tiefgelb farbloss farbloss

Tabelle II

Diphtherieserum

Filtration durch:	Es wurden durch Filtration eingeengt		Trockenrückstand aus 10 cc. in g.		Glührückstand aus 10 cc. in g.		Immunitäts-einheiten	Farbe
		Originalserum	0.975		0.058		150-200	gelblich
Agar 1%	300 cc. auf 60 cc.	Concentr. Serum Filtrate (gemischt)	2.120	 0.670	0.099	 0.042	200-300 40-80	gelb gelblich
Agar 3%	300 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum Filtrate (gemischt)	2.340	 0.278	0.104	 0.035	400-500 unter 10	tiefgelb fast farblos

O desecamento foi feito no vacuo sobre acido sulfurico e a incineração ao vermelho rubro e em todos os cazos até pezo constante. Debaixo da rubrica 3 do quadro encontramos a dezignação $^{3}/_{10}$ e $^{8}/_{10}$ que se deve entender como a terceira, ou oitava fração de 10 cc do filtrado. O resto do filtrado não foi minuciozamente pesquizado.

Os valores contidos no quadro mostram claramente que possuimos no agar um material de filtro apropriado para demonstrar com evidencia o fenomeno Bechholds. Aí vemos que, o agar a 1 % é mais permeavel para os coloides do soro que o agar a 3 %; que o agar a 3 % não permite a passajem da materia córante do soro o que não fazem os póros do agar a 1 %. Um filtro de celoidina mostra-se ainda menos permeavel para a materia córante e para os albuminoides que uma membrana de agar a 3 %.

De mais interesse são os rezultados da avaliação do reziduo de incineração. Indicam que os valores obtidos no filtrado são notavelmente menores que os referentes ao soro concentrado ou ao orijinal.

Compreende-se por si, que a só avaliação do pezo não seja suficiente para responder si se dá aqui como fato predominante a adsorção do clorureto de sodio aos coloides do soro concentrado ou se os valores a mais se referem simplesmente ás substancias inorganicas (fosforo, calcio, etc.) que estando ligadas aos albuminoides do soro creceriam naturalmente á medida que o soro se concentrasse, e que, portanto, deveriam ser calculados separadamente. A rezolução desta questão será mais tarde obtida por meio de pesquizas especiais neste sentido e no que se refere em particular á dozagem quantitativa exata dos sais inorganicos no filtrado e no soro concentrado, notadamente no que diz respeito ao clorureto de sodio.

A filtração do soro antidifterico foi feita de modo semelhante ao do soro normal, sendo porém o aparelho protejido da luz. Servimo-nos aqui tambem do filtro com camada superficial. A compozição do soro orijinal, do soro concentrado, e do ultrafiltrado

Gegensatz zu Gelatine liess sich der Agar bei der hier herrschenden hohen Lufttemperatur leichter zum Erstarren bringen, im Gegensatz zum Zelloidin besteht bei ihm die intermicellare Flüssigkeit nicht aus einem leicht flüchtigen Medium, sodass bei ihm auf eine stabilere, bei wiederholter Filterbereitung immer wieder leicht herzustellende Porengrösse gerechnet werden kann.

Um uns von der Durchlässigkeit des zu benutzenden Filtermaterials ein Bild machen zu können, wurde zunächst normales Pferdeblutserum durch Agarmembranen verschiedener Porengrösse, ferner durch Zelloidin filtriert und zwar solange, bis die Hälfte des ursprünglichen Serumvolumens durch das «überschichtete» Filter gegangen war. Beistehende Tabelle I giebt über die hierbei erzielten Resultate Aufschluss und zwar die dort eingezeichneten Trockenrückstände über den Gehalt der Filtrate und der Konzentrationssera am festen, zum grössten Teil aus Albumin bestehenden Substanzen, die Glührückstände über den an anorganischen Salzen. Das Trocknen wurde im Vacuum über Schwefelsäure, das Glühen bei starker Rotglut vorgenommen und wurde in allen Fällen solange fortgesetzt, bis Gewichtskonstanz erreicht war. Unter den in Rubrik 3 der Tabelle bei den Filtraten stehenden Bezeichnungen $^{3}/_{10}$ und $^{8}/_{10}$ sind die an dritter bezw. an achter Stelle übergegangenen Fraktionen von je 10 ccm. zu verstehen. Das übrige Filtrat wurde nicht näher untersucht.

Die in der Tabelle enthaltenen Werte zeigen uns zunächst, dass wir in dem Agar ein Filtermaterial besitzen, das geeignet ist, das Bechhold'sche Phänomen recht gut zur Veranschaulichung zu bringen. So sehen wir, dass 1 %iger Agar durchlässiger für die Serumkolloide ist wie 3 %iger, dass ferner die Poren des 3 %igen Agars dem Serumfarbstoff kaum noch den Durchtritt gestatten, während es die des 1 %igen noch thun. Ein Zelloidinfilter wies für Farbstoff und Eiweisskörper noch eine etwas geringere Durchlässigkeit als die 3 %ige Agarmembran auf.

Von weiterem Interesse sind die Ergebnisse der Glührückstandsbestimmung. Sie zeigen, dass die bei den Filtraten erhaltenen

em substancias rezistentes á desecação e ao vermelho rubro (reziduo seco e de incineração), assim como o numero de unidades imunizantes se encontram no quadro II.

Os dados que aí se acham provam que possuimos na ultrafiltração um meio de elevar até trez vezes o valor antitoxico de um soro, evitando o emprego de temperatura de certo modo elevada ou de ajentes quimicos. Infelizmente é ella inutil para a soro-terapeutica, pois com o crecer de unidades imunizantes aumenta proporcionalmente a quantidade de materias albuminoides no soro enriquecido, sendo que, apezar de se conservar o soro completamente claro, elle se torna de consistencia xaropoza, de modo a ser pouco proprio para injeções. Além disso, como mostra o quadro, uma separação de albuminoides por meio de uma membrana de agar mais permeavel é acompanhada de perda aproximadamente equivalente de antitoxina. E' de notar que na filtração de soro antidifterico não se dá a minima *adsorção* dos anticorpos ao material do filtro, quando se compara o numero total de unidades imunizantes contidas no soro primitivo com as que existem no soro concentrado e no filtrado, levando em conta os respetivos volumes, se verifica que a perda de antitoxina é minima.

A questão está limitada a saber si se póde progredir nesse sentido ou não. Nosso parecer seria precoce, dado o numero pequeno de experiencias, e as pesquizas devem ser refeitas com outra orientação por ver si se obterão indicações outras. Porém hoje já podemos dizer que a ultrafiltração só terá evidente importancia para a pratica soroterapica quando se conseguir por meio d'ella separar as materias albuminoides ou, ao menos, a sua maior parte dos anticorpos. Esta idéa será realizada no dia em que se descobrir um material de filtro, que se caraterize, de um lado, por uma capacidade de adsorção para os anticorpos e de outro pela sua solubilidade em temperatura não nociva ao imunicorpo. Com o fim de realizar este pensamento procurámos uzar a gelatina não insolubilizada para material de filtro. Não foram porém as pesquizas conti-

Werte wesentlich geringer sind als die bei dem eingeengten bezw. Originalserum erzielten.

Es leuchtet ohne weiteres ein, dass die Gewichtsfeststellung an und für sich nicht genügt, um die ebenso theoretisch wie praktisch interessante Frage beantworten zu können, ob dieser beim konzentrierten Serum erhaltene Mehrbetrag lediglich auf Rechnung der an das Eiweiss chemisch gebundenen anorganischen Substanzen (Phosphor, Calcium etc.) zu setzen ist, die ja naturgemäss mit der Konzentration des Serums wachsen müssen, oder ob hier auch die Adsorption des Chlornatriums an das eingeengte Serumkolloid eine wesentliche Rolle spielt. Die Beantwortung dieser Frage muss demgemäss späteren, speziell nach dieser Richtung hin vorzunehmenden Untersuchungen vorbehalten bleiben, bei denen es namentlich auf genaue quantitative Bestimmung der anorganischen Salze im Filtrat und Konzentrationsflüssigkeit, insbesondere des Chlornatriums ankommen wird.

Die Filtration des *Diphtherieserums* wurde in derselben Weise wie die des Normalserums bewerkstelligt, nur schützten wir den Apparat vor Tageslicht. Auch hier bedienten wir uns der «überschichteten» Filter. Der Gehalt des Originalserums, des Konzentrationsserums und des Ultrafiltrates an festen bezw. hitzebeständigen Substanzen (Trocken- und Glührückstand) sowie an Immunitätseinheiten findet sich in Tabelle II.

Die dort niedergelegten Daten beweisen, dass wir in der Ultrafiltration ein Mittel besitzen, um den Antitoxingehalt eines Serums bei Vermeidung höherer Wärmegrade und chemischer Agentien bis auf etwa das dreifache zu erhöhen. Leider ist für die serotherapeutische Praxis hierdurch vorläufig noch wenig gewonnen, denn mit dem Wachsen der Immunitätseinheiten nimmt gleichzeitig auch der Eiweissgehalt zu und die Flüssigkeit erreicht schliesslich hierdurch, wenn auch unter Beibehaltung völliger Klarheit, eine derartig stark visköse sirupartige Konsistenz, dass sie für Injektionszwecke ungeeignet wird. Andererseits ist, wie ein Blick auf die Tabelle lehrt, ein bei der Filtration durch dünnporigere Agargallerte erreichbares Eliminieren von Ei-

nuadas, devido á alta temperatura ambiente que impedia se evitasse a fluidificação da membrana de gelatina durante a experiencia. As pesquizas serão agora retomadas e praticadas tambem com outras materias filtrantes.

Literatura

1) MARTIN. Journal of Physiol. Bd. XX, S. 364.

2) H. BECHHOLD. *Die Gallertfiltration.* Kolloid-Zeitschrift, 1907, Bd. 2, S. 3 und 33.

— *Kolloidstudien mit der Filtrationsmethode.* Zeitschr. f. physikal. Chemie. 1907, Bd. 60, S. 259 und 276.

— *Ultrafiltration.* Biochem. Zeitschrift, 1907, S. 379.

3) J. DUCLAUX. *Die Filtration kolloider Lösungen.* Kolloid-Zeitschrift, 1908, Bd. 3, S. 126. (Zugleich enthaltend Literaturangaben über die im Jahre 1904 und später erschienenen Arbeiten von Borrel, Manca und Malfitano).

4) G. GIEMSA und VON PROWAZEK. *Weitere Untersuchungen über sog. ultramikroskopische Infektionserreger. Zur Filtration des Hühnerpestvirus,* Münch. med. Wochenschrift, 1908, Nr. 29.

5) S. v. PROWAZEK und H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO. *Untersuchungen über die Variola.* Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 44, S. 2265.

weiss auch mit einem Verlust einer annähernd äquivalenten Menge von Antitoxin verbunden. Bemerkenswert ist, dass bei der Filtration des Diphtherieserums eine nennenswerte *Adsorption* der Antikörper durch das Filtermaterial nicht stattfindet, denn vergleicht man die im ursprünglichen unfiltrierten Serum enthaltenen Immunitätseinheiten mit dem der Konzentrationssera bezw. Filtrate unter Berücksichtigung der betreffenden Volumina, so findet man, dass der Verlust an Antikörpern nur ein minimaler ist.

Es drängt sich nun die Frage auf, ob uns die Ultrafiltration überhaupt auf diesem Wege weiterbringen wird. Unserer Ansicht nach wäre es verfrüht, sie auf Grund dieser wenigen Versuche beantworten zu wollen, vielmehr müssen erneute, von anderen Gesichtspunkten ausgehende Experimente weiteres lehren. Soviel aber lässt sich heute schon sagen: von einschneidender Bedeutung für die serotherapeutische Praxis dürfte die Ultrafiltration erst dann werden, wenn es durch sie gelingt, das für die Immunisierung nicht in Betracht kommende Serumeiweiss oder wenigstens den grössten Teil desselben, von den Antikörpern zu trennen. Diese Idee liesse sich vielleicht durch Ausfindigmachen eines Filtermaterials verwirklichen, welches sich einerseits durch grosse Adsorptionsfähigkeit für die Antikörper auszeichnet, andererseits die Eigenschaft besitzt, später wieder bei einer mässigen, die Immunkörper nicht schädigenden Temperatur in Lösung gebracht werden zu können. Von diesem Gedanken ausgehend, versuchten wir zunächst ungehärtete Gelatine als Filtrirmaterial zu verwenden. Leider aber mussten wir die begonnenen Versuche vorläufig wieder abbrechen, da es unmöglich war, bei der z. Zt. hier herrschenden hohen Temperatur die Gelatinemembran während der ganzen Dauer eines Filtrierprozesses vor Verflüssigung zu schützen. Die Versuche sollen jedoch später wieder aufgenommen und auch auf anderes Filtermaterial ausgedehnt werden.

Erephopsis auricincta

Uma nova mutuca, da subfamilia: *Pangoninae*

pelos

Drs. Adolpho Lutz e Arthur Neiva.

(Estampa 1)

Erephopsis auricincta

Eine neue Tabanidenart aus der Subfamilie: *Pangoninae*

von

Dr. Adolpho Lutz und Dr. Arthur Neiva.

(Tafel 1)

Damos em seguida a descrição de uma nova *Pangonina* pertencente ao genero *Erephopsis,* de Rondani, acompanhada de figura em côres, bastante aumentada e que mostra bem as particularidades desta bela especie. (Est. 1).

Erephopsis auricincta n. sp.

Tamanho geral (sem a tromba) 15—16 mm.

Probocida de côr preta, com 6 mm. de comprimento; palpos pardo-ferrujineos; antenas com os dois articulos bazilares enegrecidos, o terceiro ferrujinozo, um pouco enegrecido na baze e no apice; face castanho-escura, quazi sem brilho; fronte e vertice com fundo da mesma côr, o ultimo com pelos pretos curtos e ocelos distintos de brilho amarelado escuro; olhos escuros, com pubecencia enegrecida; barba castanho-escura de reflexos amarelados e arruivados; occiput com a marjem ocular prateada e o resto cinzento com pelos dourados curtos e finos.

Torax, em cima enegrecido, com penujem escura de reflexos dourados e trez estrias lonjitudinais escuras, mais distintas na metade anterior; entre os hombros e os encontros das azas ha pelos mais compridos e completamente escuros; em baixo os pelos têm a côr parecida á da barba; o escutelo é coberto de pelos aveludados, bastante compridos, negros no meio e mais castanhos nas partes laterais.

Wir geben im Folgenden die Beschreibung einer neuen *Pangonine,* die in das Genus *Erephopsis* Rondani gehört, zugleich mit einer ziemlich vergrösserten farbigen Figur, welche die Eigenthümlichkeiten dieser hübschen Art zeigt. (Taf. 1).

Erephopsis auricincta n. sp.

Durchschnittslänge (ohne Rüssel) 15—16 mm.

Rüssel schwarz, 6 mm. lang; Palpen hell rostbraun; Antennen: die beiden Basalglieder schwärzlich, das dritte rostroth und nur an Basis und Spitze etwas schwärzlich; Untergesicht dunkelbraun und fast ohne Glanz; Stirn und Scheitel mit ebenso gefärbtem Grunde, der letztere mit schwarzen Härchen und deutlichen, dunklen Ocellen mit gelblichem Glanze; Augen dunkel, schwärzlich behaart; Bart dunkelbraun mit gelblichem und röthlichem Schimmer; Hinterkopf mit silberglänzendem Augenrande, der Rest grau, mit feinen goldenen Härchen.

Thorax oben schwärzlich mit dunklem, goldschimmerndem Flaum und drei dunklen Längsstreifen, welche in der vorderen Hälfte deutlicher sind; zwischen den Schultern und den Flügelwurzeln sind die Haare länger und ganz dunkel; auf der Unterseite haben sie dieselbe Farbe, wie der Bart; das Schildchen ist mit ziemlich langen sammtartigen Haaren

Castro Silva

Abdomen, em cima, de fundo preto, mostrando na marjem posterior de todos os segmentos pelos finos e brilhantes, á maneira de cintas de côr de ouro; estas, nos segmentos 2, 3, 4 e 5, são bastante alargadas no meio e um pouco menos dos lados; em baixo as cintas são um pouco mais palidas e de largura mais uniforme.

Pernas: *coxae* e *femora* enegrecidos com pubecencia preta, o resto castanho-ferrujinozo bastante claro com pelos amarelados, curtos, sendo apenas a extremidade dos pés um pouco mais escura.

Azas lijeiramente acinzentadas, mais amareladas na rejião da costa, as nervuras de um pardo ferrujinozo, mais declarado na parte amarelada. Primeira celula da marjem posterior e tambem a anal, fechadas um pouco antes da marjem; o ramo anterior da nervura forquilhada em angulo bastante acuzado e ás vezes com apendice brevissimo; balancins castanhos, com a parte apical do capitulo de côr mais clara.

A descrição é fundada no exame de cinco femeas apanhadas em Barbacena (Minas Geraes) no mez de março 1907 pelo Dr. Belisario Penna.

besetzt, welche in der Mitte mehr schwarz und auf den Seiten mehr braun sind.

Abdomen oben mit schwarzem Grunde, der Hinterrand der Segmente mit hellen Härchen besetzt, welche goldfarbige Querbinden bilden, die an den Segmenten 2—5 in der Mitte stark und an den Rändern etwas weniger verbreitert sind; auf der Unterseite sind die Binden heller und von mehr gleichmässiger Breite.

Beine an den Hüften und Schenkeln schwärzlich, mit schwarzem Flaum; der Rest ziemlich hell rostbraun, mit gelblichen Härchen und nur an den Enden der Füsse etwas dunkler.

Flügel leicht graulich, in der Costalregion mehr gelblich; die Adern rostbraun, in den gelben Partien mehr auffallend; erste Hinterrands- und Analzelle etwas vor dem Rande geschlossen; der erste Ast der Gabelader mit deutlich ausgesprochenem Winkel und manchmal mit einem ganz kurzen Anhängsel; Halteren braun, am Ende der Capitula etwas heller.

Es liegen fünf weibliche Exemplare vor, welche von Dr. Belisario Penna im März 1907 in Barbacena (Minas Geraes) gesammelt wurden.

O sôro anti-pestozo

pelo

Dr. Figueiredo Vasconcellos

Chefe de serviço no Instituto

Le sérum anti-pesteux

par le

Dr. Figueiredo Vasconcellos

Chef de service à l'Institut

Em 1900 apareceu pela primeira vez a peste no continente americano, sendo Santos o primeiro porto do Brazil onde fez erupção.

O governo brazileiro justamente alarmado por esse fato cojitou imediatamente de fundar um Instituto onde fosse preparado o sôro anti-pestozo, o que fez, entregando a sua direção tecnica ao dr. Oswaldo Gonçalves Cruz.

Era a incumbencia muito ardua e espinhoza, pois que, ha pouco tempo apenas, havia sido iniciado o tratamento da peste pelo sôro especifico, de modo que nada havia ainda de precizo sobre o seu preparo.

Com efeito, nessa epoca a literatura bacteriolojica pouco rejistrava a esse respeito. Borrel, Calmette e Yersin, que foram os primeiros que tentaram preparar animais pela inoculação de bacilos da peste, com o fim de obter um sôro especifico, nas publicações feitas nos Anaes do Instituto Pasteur, referiam-se apenas de modo geral aos procesos que empregaram. Assim, dizem que inocularam bacilos da peste sob a pele dos animais, mas como obtinham grande numero de abcessos rezolveram fazer a inoculação intra-venoza. Quando chegam á inoculação dos cavalos, para a obtenção de sôro terapeutico, referem-se ao emprego de culturas do bacilo mortas pelo calor, não indicando, porém, as quantidades inoculadas.

En 1900, la peste fit sa première apparition sur le continent américain. Santos fut le premier port du Brésil où elle se déclara.

Justement alarmé, le gouvernement brésilien eut aussitôt l'idée de créer un Institut où l'on préparât le sérum antipesteux. L'Institut fut fondé, et sa direction technique confiée au docteur Oswaldo Gonçalves Cruz.

La mission était bien délicate et difficile. Le sérum spécifique commençait à peine à être employé pour le traitement de la peste, de sorte qu'il n'existait rien de précis sur ce point au sujet duquel la littérature bactériologique était d'une grande pauvreté. Les premiers qui essayèrent de se servir des animaux pour l'inoculation des bacilles de la peste pour obténir un sérum spécifique ont été Borrel, Calmette et Yersin. Ils rapportent d'une façon générale, en des articles publiés dans les Annales de l'Institut Pasteur, qu'ils inoculèrent des bacilles de la peste sous la peau des animaux, mais comme il se produisait un grand nombre d'abcès, ils ont résolu faire l'inoculation intraveineuse. Quant ils arrivent à l'inoculation des chevaux, pour obtenir le sérum thérapeutique, ils nous parlent de l'emploi de cultures de bacilles tués par la chaleur, sans toutefois spécifier les quantités inoculées.

Après quelques essais, le docteur Oswaldo Cruz, forcé par les circonstances, adopta le

Forçado pelas circumstancias e depois de alguns ensaios, o dr. Oswaldo Cruz firmou a seguinte tecnica, que durante muito tempo foi a uzada no Instituto, para o preparo dos cavalos que deveriam fornecer o sôro anti-pestozo.

Uma garrafa de Roux de 20 cm. de comprimento por 11 cm. de largura, contendo geloze simples, apresentando, portanto, o meio nutritivo a superficie de 220 cm.², é semeada com 1 ou 2 cc de cultura em caldo de um bacilo da peste pouco virulento. Conservada na temperatura ambiente e passadas 48 horas a cultura dezenvolvida em superficie, verificada a sua pureza, é emulsionada em 16cc de agua fiziologica a 0.75 %. Recolhida a emulsão é ella esterilizada entre 65 a 68º durante 1 hora. Com esta emulsão esterilizada é que se começava o preparo dos cavalos, que deveriam fornecer o sôro anti-pestozo. Eram estes inoculados intravenozamente com 1, 2, 4, 8, 12 e 16cc dessa emulsão, variando o prazo, em geral de 20 a 30 dias, entre uma e outra das primeiras inoculações, e de um a 2 mezes nas ultimas, conforme a reação que aprezentava o animal. Este só é novamente inoculado depois de ter readquirido seu pezo primitivo. Inoculados os 16cc, isto é, toda a cultura dezenvolvida em uma garrafa, passava-se a fazer a inoculação de culturas vivas, utilizando-se ainda esse mesmo bacilo pouco virulento. Inoculados os 16 cc de emulsão, destes bacilos eram injetados então germens muito virulentos. Nesta serie, porém, principiava-se pela inoculação de 4cc de emulsão, seguidas das de 8, 12 e 16cc. Só então é que o animal considerado suficientemente imunizado começava a fornecer sôro anti-pestozo.

Quer para os bacilos de pouca quer para os de muita virulencia, o modo de preparar a emulsão é sempre o mesmo que já foi descrito, assim como é conservada a já referida série de dózes de inoculação.

O bacilo da peste pouco virulento que empregamos é o mesmo que foi izolado pelo Dr. Oswaldo Cruz, em Santos, em 1900, quando alí foi comissionado pelo Governo Federal para determinar a especie morbida procédé suivant — lequel fut longtemps employé à l'Institut — pour le traitement des chevaux qui devaient fournir le sérum antipesteux.

Une bouteille de Roux de 20 cm. de long sur 11 de large, contenant de la gélose simple — le milieu nutritif présentant donc une superficie de 220 cm.² — est ensemencé avec 1 ou 2 cc. d'une culture en bouillon d'un bacille de la peste peu virulent. Conservée à la temperature ambiante, au bout de 48 heures, la culture s'est développée en surface; après en avoir vérifié la pureté, on l'émulsionne avec 16 cc. d'eau physiologique à 0,75 %. On recueille l'émulsion et on la stérilise pendant une heure entre 65 et 68º. C'est avec cette émulsion stérilisée que l'on commençait le traitement des chevaux qui devaient fournir le sérum antipesteux: On leur faisait des inoculations intraveineuses, en laissant généralment un intervalle de 20 à 30 jours entre chacune des premières inoculations et d'un à deux mois, pour les dernières, selon la réaction observée chez l'animal, qui n'était inoculé de nouveau, qu'après avoir acquis son poids primitif. Les 16 cc. une fois inoculés (c'est à dire: toute la culture développée dans une bouteille) on passait à faire l'inoculation de bacilles vivants, en employant toujours ce même bacille peu virulent. On inoculait les 16, cc. d'émulsion de ces bacilles, après quoi l'on injectait alors des germes très virulents. Mais dans cette série, on commençait par l'inoculation de 4 cc. de l'émulsion, en passant ensuite à 8, 12 et 16 cc. Ce n'est qu'alors que l'animal était considéré comme suffisament immunisé et commençait à fournir du sérum antipesteux.

Qu'il s'agisse de bacilles peu virulents ou très virulents, la façon de préparer l'émulsion est toujours la même qui vient d'être exposée, bien comme la série de doses à inoculer.

Le bacille de la peste peu virulent, que nous employons est le même qui a été isolé, en 1900 par le Dr. Oswaldo Cruz, à Santos, quand il y fut envoyé en commission par le Gouvernement Fédéral pour déterminer l'espèce morbide qui y régnait alors. On l'inocule tous les six mois dans l'organisme d'un co-

reinante. E' o bacilo passado de 6 em 6 mezes pelo organismo da cobaia, sendo necessario fazer a inoculação intraperitoneal de 2 cc. de uma cultura em caldo, de 48 horas, para se obter a morte do animal.

Os bacilos da peste de forte virulencia são inoculados mensalmente em ratos e cobaias. As nossas culturas da peste são conservadas em geloze simples e na temperatura ambiente.

Pela descrição do processo que acabo de fazer, é facil compreender que o tempo necessario para se obter um cavalo solidamente imunizado, de modo a poder fornecer um bom sôro, é muito longo, não só pelo grande numero de inoculações necessarias, como tambem pelos acidentes que aparecem no decurso do processo imunizante, e que obrigam a distanciar, umas das outras, as inoculações.

Foi por isso modificada a tecnica até então seguida, sendo completamente abolidas as inoculações de culturas mortas.

Eis como procedemos agora: o titulo da emulsão empregada continúa o mesmo $^1/_{16}$, assim tambem a série de dózes de inoculação, variando porém o numero dellas. O animal recebe desde o inicio da imunização inoculações de culturas vivas do bacilo de fraca virulencia, e somente as 3 primeiras dózes da série, isto é, 1, 2 e 4 cc. da emulsão. Passa-se imediatamente a fazer inoculações de culturas vivas dos bacilos de forte virulencia, com estes, então, procede-se á inoculação de toda a série. Quer com um quer com outro bacilo, as inoculações são sempre intravenozas.

Confrontando-se os 2 metodos, vê-se que antigamente era necessario proceder-se a 16 inoculações (6 de cultura morta, 6 de cultura viva de fraca virulencia, e 4 de cultura viva de forte virulencia) para que o cavalo fosse considerado pronto a fornecer o sôro antipestozo, ao passo que hoje ha mister tão somente de 9 inoculações (3 de cultura viva, fraca virulencia e 6 de cultura viva de forte virulencia) para se obter identico rezultado.

O exame dos 2 seguintes quadros mostra claramente o tempo que se ganha com o

baye. Pour obtenir la mort de l'animal, il est nécessaire de faire l'inoculation intrapéritionale de 2 cc. d'une culture en bouillon, de 48 heures.

Les bacilles de la peste de grande virulence, sont inoculés tous les mois à des rats et des cobayes. Nos cultures de peste sont conservées dans la gélose simple et à la température du laboratoire.

Par la discription que je viens de faire du procédé, on comprendra facilement qu'il faille un assez long temps pour obtenir un cheval solidement immunisé et qui puisse fournir un bon sérum. Cela est dû non seulement au grand nombre d'inoculations nécessaires, mais encore aux accidents qui surviennent au cours de l'opération immunisante et qui obligent à espacer les inoculations. Nous avons donc modifié les procédés employés jusqu'alors, en supprimant les inoculations de cultures mortes.

Voici comme nous procédons aujourd'hui:

Le titre de l'émulsion reste toujours le même, $^1/_{16}$, ainsi que la série de doses à inoculer; ce qui varie, c'est le nombre d'inoculations. Dès le debut de l'immunisation, l'animal reçoit des inoculations de cultures vivantes du bacille d'une faible virulence, et seulement les 3 premières doses, c'est à dire 1, 2 et 4 cc. de l'émulsion. On passe aussitôt à faire des inoculations de cultures vivantes des bacilles de forte virulence. Ceux-ci servent à l'inoculation de toute la série. Qu'il s'agisse de l'un ou de l'autre des bacilles, les inoculations sont toujours intraveineuses.

En comparant les deux méthodes, on voit qu'il fallait autrefois procéder à 16 inoculations (6 de culture morte, 6 de culture vivante, de faible virulence et 4 de culture vivante, de forte viruience) pour que le cheval fût considéré prêt à fournir le sérum antipesteux, tandis qu'aujourd'hui il n'en faut plus que 9 (3 de culture vivante, de faible virulence et 6 de culture vivante, de forte virulence) pour arriver au même résultat.

L'examen des deux tableaux suivants montre clairemeut le temps gagné par l'emploi de notre méthode actuelle d'immunisation:

emprego do nosso atual metodo de imunização:

I

PESTE MORTA Germen de fraca virulencia					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVA Germen de fraca virulencia					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVA Germen de forte virulencia			
4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

II

PESTE VIVA Germen de fraca virulencia			
4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVA Germen de forte virulencia					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

Ha quatro anos que é este metodo uzado no preparo dos cavalos fornecedores de sôro anti-pestozo no nosso Instituto, e até hoje só temos a rejistrar um unico cazo de perda do animal. Os cavalos suportam-no perfeitamente, desde que haja prudencia e cuidado com as inoculações. Infelizmente, nem sempre se pode seguir com regularidade o processo imunizante, inoculando-se umas apoz outras, as dózes estabelecidas na serie. Muitas vezes quando se procede á inoculação da dóze imediatamente superior á inoculada, os fenomenos que aprezenta o animal são de tal ordem que manda a prudencia cessar a inoculação, ainda em quantidade menor que a já injetada, para evitar, talvez, a morte do animal.

I

PESTE MORTE Germe de faible virulence					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVANTE Germe de faible virulence					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVANTE Germe de forte virulence			
4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

II

PESTE VIVANTE Germe de faible virulence		
1 cc.	2 cc.	4 cc.

PESTE VaVANTE Germe de forte virulence					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

Voilà quatre ans que cette méthode est employé à notre Institut pour préparer les chevaux destinés à fournir le sérum antipesteux, et jusqu'aujourd'hui nous avons à signaler un seul cas de mort parmi eux. Ils s'en trouvent parfaitement bien pourvu que les inoculations soient faites avec soin et prudence. On ne peut malheuresement employer avec régularité le procédé immunisant, en inoculant l'une après l'autre les doses déterminées dans la série. Et souvent, tandis que l'on procède à l'inoculation de la dose immédiatement supérieure à celle qui vient d'être inoculée, les phenomènes que présente l'animal sont tels que la prudence nous enjoint de cesser l'inoculation, même si la quantité inoculée est inférieure à la précedente, afin d'éviter la mort possible de l'animal.

São imediatas ou mediatas as reações que aprezenta o cavalo depois da inoculação.

As imediatas são constituidas por dispnéa, mais ou menos intensa, tosse, contrações musculares, estado vertijinozo e suores.

A dispnéa é a mais frequente das reações, podendo variar em intensidade, não dependendo isto da quantidade de emulsão inoculada; pois que o mesmo animal pode aprezentar intensa dispnéa com pequena dóze, e quasi nula com dózes mais elevadas. Não tem tambem influencia o gráu de imunização, visto que um animal que já suportou 16 cc de emulsão, póde aprezentar uma dispnéa intensissima com dóze muito inferior a esta.

A tosse acompanha quazi sempre a dispnéa; vem por acessos que se sucedem uns aos outros.

As contrações musculares observam-se nos membros, principalmente nos posteriores. O animal contrae lentamente um dos membros, vendo-se em relevo os musculos contraidos, para depois distendel-o tambem vagarozamente. Estas contrações são alternadas, levantando o cavallo, ora um, ora outro membro posterior. Não é raro observar-se contrações fibrilares nos musculos das coxas e de outras rejiões.

O estado vertijinoso é tambem muito comum: o animal cambaleia, tenta firmar-se d'um lado para imediatamente apoz firmar-se do outro. A's vezes este estado não vae alem disso; em outros cazos, porém, progride de modo que, si se fizer o animal andar, a marcha se torna dificil, não levantando bem os pés e arrastando a parte anterior dos cascos. Si é obrigado a correr, os membros enrijam, batendo uns nos outros durante a corrida, lançando-se o corpo ora para um, ora para o outro lado. Este estado pode adquirir tal intensidade que o animal cae, debatendo-se por levantar-se, o que só consegue com muito esforço.

A's vezes pouco depois da inoculação o animal fica de cabeça baixa, os membros afastados para melhor se conservar em equilibrio, os flancos batem fortemente, intervin-

Les réactions que présente le cheval après l'inoculation sont immédiates ou médiates.

Les immédiates sont les suivantes: dyspnée, plus ou moins forte, toux, contractions musculaires, état vertigineux, sueur.

La plus fréquente d'entre elles est la dyspnée, dont l'intensité peut varier, ce qui ne dépend pas de la quantité d'émulsion inoculée, car l'animal peut souffrir d'une dyspnée intense, avec une petite dose, ou d'une dyspnée presque nulle, avec des doses plus fortes. Le degré d'immunisation n'exerce pas non plus d'influence là-dessus, puisqu'un animal qui a déjà supporté 16 cc. d'émulsion peut être attaqué d'une dyspnée très violente, avec une dose bien inférieure á celle-là.

La toux accompagne presque toujours la dyspnée; elle vient par accès qui se succèdent sans interruption.

On observe les contractions musculaires dans les membres, surtout dans les membres postérieurs. L'animal contracte lentement un des membres — les muscles contractés se dessinent en relief — pour le détendre ensuite avec la même lenteur.

Ces contractions sont alternés; le cheval soulève tantôt l'un tantôt l'autre des membres postérieurs. Il n'est pas rare d'observer des contractions fibrillaires dans les muscles des cuisses et d'autres régions.

L'état vertigineux est aussi très commun: l'animal chancelle, cherche à s'affermir d'un côté pour s'appuyer de l'autre, aussitôt après. Quelquefois, les choses en restent là; mais en d'autres occasions cet état empire, de sorte que, si l'on oblige l'animal à avancer, la marche lui devient difficile: il ne lève pas les pattes et laisse trainer la partie antérieure des sabots. Si on le fait courir, ses membres durcissent; ils se cognent l'un contre l'autre pendant la course, avec des rejets du corps à droite et à gauche. Cet état peut arriver à un tel point d'intensité que l'animal tombe, en se débattant pour tâcher de se relever, ce qu'il n'arrive à faire qu'au prix de grands efforts.

Parfois, peu après, l'animal conserve la tête baissée; il écarte les pattes pour mieux garder l'équilibre, ses flancs halètent avec force et le diaphragme intervient puissamment

do poderozamente para a respiração o diafragma e aprezentam então uma forte crize de suor. Vêm-se aparecer entre os pelos as gotas de suor que se vão reunindo e caindo pelas partes em declive. Em pouco tempo o suor escorre por todo o corpo do animal e o chão, em baixo, mostra grande quantidade de liquido que d'elle cahiu.

As reações mediatas são constituidas pela elevação de temperatura, perda de pezo, tumefação do escroto, e tardiamente as artrites e queda de pelos.

A elevação de temperatura dá-se, em geral, pouco depois da inoculação, podendo a hipertermia atingir 1 a 2.º acima da normal. Passadas 24 horas, porém, comumente é observada a queda, sinão á normal, ao menos ás suas proximidades.

Raro é o cavalo que, 24 horas depois da inoculação não tenha perdido pezo. Geralmente a diminuição é pequena, de 6 a 10 kilos, porém, já observámos, que alguns aprezentavam uma diminuição de 20 a 30 quilos.

A tumefação do escroto é reação não muito rara. Aumentado de volume, a bolsa se torna distendida, tensa e a pele luzidia. Os testiculos aumentam de volume. Na vajinal não se rèvela a prezença de liquido. Comumente, 48 horas depois tudo desaparece voltando o escroto ao tamanho natural.

As artrites manifestam-se, em geral tardiamente. Localizam-se, geralmente, nas articulações dos membros, podendo porém, aparecer em todas as outras articulações. Já observámos um cavalo que aprezentava artrites, nas articulações da coluna vertebral, mas em outro as artrites apareceram não só nesse ponto como nas articulações de todos os membros. Nestes cazos os animaes se movem muito lentamente, sendo muito dificil voltarem-se, só o podendo fazer quando ha espaço amplo para uma longa curva.

As artrites são no começo acompanhadas de elevação de temperatura, que se prolonga durante alguns dias. Concomitantemente ha grande perda de pezo, pois que o

pour la respiration. Il a alors un fort accès de transpiration. On voit poindre à l'extrémité des poils les gouttes de sueur qui se rejoignent et coulent tout le long du corps. En peu de temps, l'animal est en nage et l'on peut voir sous lui le sol complètement trempé.

Les réactions médiates se font remarquer par l'élévation de la température, la diminution du poids, tuméfaction du scrotum, et, plus tard, l'arthrite et la perte des poils.

La température s'élève, en général, peu après l'inoculation; elle peut arriver à 1 ou 2º au dessus de la normale, mais elle tombe communément au bout de vingt-quatre heures, sinon jus'quà la normale, au moins jusque dans son voisinage.

Il est rare que, vingt-quatre heures après l'inoculation, un cheval n'ait pas perdu de son poids.

La perte n'est généralement pas très grande: de 6 à 10 kilos. Nous en avons cependant observé quelques uns qui accusaient une diminution de 20 à 30 kilos.

La tuméfaction du scrotum est une réaction assez fréquente. L'accroissement de volume produit une tension de la bourse, dont la peau devient luisante et tirée. Les testicules augmentent. L'examen ne rèlève pas la présence de liquide. Tout disparait d'ordinaire au bout de 48 heures, et le scrotum revient à ses proportions normales.

Les arthrites ne se manifestent d'habitude que plus tard. Elles se localisent le plus souvent dans les articulations des membres, mais elles peuvent pourtant apparaître dans toutes les autres. Nous avons déjà observé un cheval qui ne présentait d'arthrites qu'aux articulations de la colonne vertébrale; mais chez un autre, les arthrites étaient apparues non seulement au même endroit mais encore aux articulations de tous les membres. En ce dernier cas, les animaux se meuvent très lentement; ils ne peuvent se retourner qu'avec une grande difficulté, et seulement lorsque l'espace est assez large pour qu'ils puissent faire une grande courbe. La perte des poils accompagne souvent les arthrites.

Celles-ci provoquent, au débout, une élévation de température qui se prolongue pen-

animal pouco come. Conserva-se quazi sempre imovel, de cabeça baixa recuzando a alimentação. Desde, porém, que a temperatura cae e que o processo articular inflamatorio começa a regressar, volta o apetite e o estado do animal melhora, voltando elle rapidamente ao seu primitivo estado.

Muitas vezes as artrites são acompanhadas da queda dos pelos.

Os fenomenos que aparecem logo apóz a inoculação cedem em geral muito rapidamente, e a não ser que assumam proporções assustadoras, nada se deve fazer para combatel-os. Quando, porém, a dispnéa for muito intensa e o estado vertijinozo que em geral a acompanha, fôr grande, deve-se fazer o animal caminhar, e, até si possivel for, correr, com o que tudo cederá. Si apezar disso, o estado do cavalo não melhorar, serão lançados baldes de agua fria sobre a cabeça do animal; si com isso ainda não fôr obtido o rezultado dezejado e continuarem os sintomas alarmantes e que o animal venha a cair, ficando prostrado, a frição de todo o torax com escovas grossas, derramando-se alcool sobre as partes fricionadas fará em breve reanimar o animal, cujo estado melhorará pouco a pouco, até o dezaparecimento completo de todos esses sintomas.

As manifestações tardias não reclamam intervenção alguma, cessando com o repouzo e o tempo. Dellas só tem importancia as artrites. Deve-se tomar cuidado extraordinario, com a nova inoculação que se tiver de fazer no animal que as tenha aprezentado. Só deverá ser feita depois que o mesmo estiver completamente restabelecido, tendo readquirido o pezo primitivo. A dóze de inoculação não deve ser aumentada, e sim egual á que já tiver sido injetada. Assim procedendo, muito provavelmente, nada sofrerá com a inoculação.

No preparo do sôro anti-pestozo é de grande importancia o sequestro do animal durante o tempo em que perdura na circulação o germen da peste inoculado. E isto se torna principalmente questão capital nos paizes tropicaes, como o nosso, em que ha grande numero de insetos sugadores.

dant plusieurs jours. Le poids de l'animal diminue aussi sensiblement, puisqu'il mange peu. Il reste presque toujours immobile, la tête basse, refusant toute nourriture. Mais, dès que la température s'abaisse et que le procéssus articulaire inflammatoire commence à diminuer l'appétit revient, l'état de l'animal s'améliore et il recouvre bientôt sa vigueur première.

Les phénomènes qu'on observe aussitôt après l'inoculation, disparaisent en général très vite, et sauf les cas où ils prennent un caractère sérieux, on ne doit rien faire pour les combattre. Si cependant la dyspnée est très intense et l'état vertigineux, qui l'accompagne la plupart du temps, est vif, il faut faire marcher l'animal; le faire même courir, si possible, et les symptomes cederont. Si malgré tout, l'état de l'animal ne se modifie pas, on lui jettera de l'eau sur la tête; si ce traitement ne produit pas d'effet, que les symptomes alarmants continuent à se manifester et que l'animal vienne à tomber et reste couché sur le sol, on le ranimera en lui frictionnant le thorax avec de grosses brosses et en versant de l'alcool sur les parties frictionnées. Il se remettra peu à peu, jusqu'à la disparition totale de tous ces symptomes.

Les manifestations qui ne se produisent qu'au bout d'un certain temps n'exigent aucune intervention. Le temps et le repos se chargent de les faire cesser. Seules les arthrites ont, alors une assez grande importance, et il faut prendre bien garde à la nouvelle inoculation faite à l'animal qui en est attaqué. Elle ne devra être faite qu'après son complet rétablissement, lors'qu'il aura acquis son poids primitif. La dose à inoculer ne devra pas être augmentée; elle sera identique à la précedente. En agissant ainsi, l'animal n'aura très probablement rien à craindre de l'inoculation.

Dans la préparation du sérum antipesteux, il convient — et c'est là un point capital — d'isoler l'animal tous le temps que le germe de la peste inoculé circule en son corps. C'est là une chose de très grande importance, surtous dans les pays tropicaux, come le notre, où il existe un grand nombre d'insects suceurs.

Com o fim de determinar o prazo em que devia permanecer izolado o animal apoz a inoculação, fizemos, auxiliado pelo nosso companheiro de trabalho Antonio Cardoso Fontes, uma serie de experiencias com o fim de verificar durante quanto tempo se mantinham vivos no sangue do cavalo os bacilos da peste inoculados.

Nas nossas experiencias uzámos sempre da seguinte tecnica: inoculado o cavalo eram retirados, ao fim do tempo dezejado, da veia jugular oposta áquella em que fora feita a inoculação, certa quantidade de sangue que era imediatamente semeada em caldo. O sangue era colhido diretamente da veia, sendo esta puncionada pela agulha, montada em seringa comum, atravessando-se todas as camadas superpostas á veia. A rejião puncionada era previamente raspada á navalha, dezinfetada com solução de sublimado a $^1/_{1000}$, lavada em seguida com alcool absoluto e depois com eter.

Com estes cuidados, ou obtinhamos constantemente culturas puras, ou o meio se conservava esteril. Recolhiamos, geralmente, 5 cc. de sangue que eram semeiados em 100 cc. de caldo simples, mas nas colheitas feitas 24 horas depois da inoculação eram recolhidos 20 cc. de sangue os quais eram semeados em 500 cc. de caldo.

Estes estudos foram feitos em cavalos que já estavam imunizados ou em via de imunização.

Os seguintes quadros dão em minucia os rezultados obtidos:

Afin de déterminer le temps pendant lequel l'animal doit être isolé, aprés l'inoculation, nous avons fait, avec l'aide de notre confrère Antonio Cardoso Fontes, une série d'experiences en vue de vérifier pendant combien de temps les bacilles de la peste inoculés se conservent vivants dans le sang du chaval. Dans nos expériences, nous avons toujours procédé comme suit: Une fois le cheval inoculé et au bout du temps nécessaire, nous prelevyions de la veine jugulaire opposée à celle où l'inoculation avait été faite, une certaine quantité de sang qui était aussitôt ensemencé dans du bouillon. Le sang était directement recueilli de la veine que l'on ponctionnait au moyen d'une aiguille montée sur une seringue ordinaire, qui traversait toutes les couches de tissus situés au dessus de la veine. La région ponctionnée était d'abord rasée, puis désinfectée avec une solution de sublimé à $^1/_{1000}$ et lavée avec de l'acool pur et, ensuite, de l'éther.

Avec ces précautions, nous obtenions régulièrement des cultures pures ou bien le milieu se conservait stérile. Nous recueillions en général 5 cc. de sang que nous semions ensuite dans 100 cc. de bouillon simple; mais si le sang était prélevé dans les 24 heures qui suivaient l'opération, nous en obtenions 20 cc., que nous semions dans 500 cc. de bouillon.

Ces expériences ont été faites sur des chevaux qui étaient déjà immunisés ou en voie d'immunisation.

Les tableaux suivants donnent une idée détaillée des résultats obtenus:

Cheval 1

Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
1 cc	f	5 cc	1	100 cc	. . .	+
2 cc	f	5 cc	5	100 cc	. . .	+
8 cc	f	5 cc	6	100 cc	. . .	+
»	»	»	7	»	. . .	+
»	»	20 cc	27	500 cc	. . .	—
12 cc	f	5 cc	14	100 cc	. . .	+
»	»	»	15	»	. . .	+
»	»	»	16	»	. . .	+
16 cc	f	5 cc	22	100 cc	. . .	+
»	»	»	24	»	. . .	+
»	»	»	26	»	. . .	+
4 cc	F	5 cc	8	100 cc	39°.7	+
»	»	»	10	»	39°.9	+
»	»	»	12	»	39°.9	+
5 cc	F	5 cc	17	100 cc	39°.8	+
»	»	»	19	»	39°.4	+
»	»	»	21	»	39°.6	+
»	»	20 cc	24	500 cc	39°.6	+
8 cc	F	5 cc	17	100 cc	37°.8	+
»	»	»	19	»	37°.4	+
»	»	20 cc	21	500 cc	37°.8	—
»	»	»	24	»	38°.2	—
8 cc	F	5 cc	20	100 cc	39°.5	—
»	»	»	22	»	38°.5	—
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.8	+

Legende:

F - germes de forte virulence. + il y a eu de culture. S - sang.
f - germes de faible virulence. — il n'y a pas eu de culture. H - heures.

Cheval 2

Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
16 cc	F	20 cc	24	500 cc	38.5	+

Cheval 5

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
12 cc	F	5 cc	18	100 cc	. . .	+
»	»	»	21	»	. . .	+
»	»	20 cc	24	500 cc	. . .	—
12 cc	F	5 cc	20	100 cc	40°.0	+
»	»	»	22	»	40°.2	+
»	»	20 cc	24	500 cc	40°.0	+
»	»	»	26	»	40°.0	+
16 cc	F	5 cc	20	100 cc	38°.2	+
»	»	»	22	»	38°.2	+
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.4	+
16 cc	F	5 cc	17	100 cc	39°.2	+
»	»	»	19	»	38°.4	+
»	»	»	21	»	38°.2	—
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.5	+

Cheval 8

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Resultat	Temp.	Resultat
14 cc	F	5 cc	17	100 cc	39°.6	+
»	»	»	19	»	38°.6	+
»	»	»	21	»	38°.0	+
»	»	20 cc	24	500 cc	39°.2	—
16 cc	F	5 cc	15	100 cc	39°.4	—
»	»	»	17	»	38°.9	—
»	»	»	19	»	39°.2	—
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.4	—

Cheval 9

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
16 cc	F	5 cc	14	100 cc	. . .	—
»	»	»	16	»	. . .	—
»	»	»	18	»	. . .	—
»	»	»	20	»	. . .	—
8 cc	F	5 cc	7	100 cc	40°.2	+
»	»	»	10	»	40°.0	—
10 cc	F	5 cc	7	100 cc	40°.2	+
»	»	»	8	»	40°.0	+
»	»	»	9	»	39°.9	+
»	»	20 cc	24	500 cc	40°.6	+
16 cc	F	5 cc	18	100 cc	38°.2	—
»	»	»	20	»	38°.0	—
»	»	20 cc	22	500 cc	39°.0	—

Cheval 11

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
16 cc	f	5 cc	20	100 cc	. . .	—
»	»	»	22	»	. . .	—
»	»	20 cc	24	500 cc	. . .	—
16 cc	f	5 cc	9	100 cc	. . .	+
»	»	»	11	»	. . .	+
»	»	»	13	»	. . .	+

Cheval 12

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
4 cc	f	5 cc	1	100 cc	. . .	+
»	»	»	2	»	. . .	+
12 cc	f	5 cc	3	100 cc	. . .	+
»	»	»	4	»	. . .	+
16 cc	f	5 cc	10	100 cc	. . .	+
»	»	»	11	»	. . .	+
»	»	»	12	»	. . .	+
4 cc	F	5 cc	10	100 cc	. . .	+
»	»	»	12	»	. . .	+
»	»	»	14	»	. . .	+
»	»	»	16	»	. . .	+
8 cc	F	5 cc	15	100 cc	38°.5	—
»	»	»	17	»	38°.0	—
»	»	»	19	»	38°.0	—
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.1	—
12 cc	F	5 cc	17	100 cc	37°.6	—
»	»	»	19	»	37°.6	—
»	»	20 cc	24	500 cc	37°.6	—
12 cc	F	5 cc	18	100 cc	39°.2	+
»	»	»	20	»	39°.0	+
»	»	20 cc	24	500 cc	39°.2	+
»	»	»	48	»	40°.2	+

Cheval 14

Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
1 cc	f	5 cc	15	100 cc	. . .	+
»	»	»	30	»	. . .	+
»	»	»	45	»	. . .	+
»	»	»	1	»	. . .	+
2 cc	f	5 cc	2	100 cc	. . .	+
»	»	»	4	»	. . .	+
»	»	»	6	»	. . .	+
»	»	»	8	»	. . .	+
4 cc	f	5 cc	8	100 cc	. . .	+
»	»	»	10	»	. . .	+
»	»	»	12	»	. . .	—
»	»	»	14	»	. . .	—
8 cc	f	5 cc	10	100 cc	. . .	+
»	»	»	12	»	. . .	+
»	»	»	14	»	. . .	—
»	»	»	16	»	. . .	—
10 cc	f	5 cc	15	100 cc	40°.2	+
»	»	»	17	»	40°.2	+
»	»	»	19	»	40°.2	—
»	»	»	21	»	40°.6	—

Cheval 14

Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
12 cc	f	5 cc	17	100 cc	39°.8	—
»	»	»	19	»	39°.0	—
»	»	»	21	»	39°.6	—
»	»	20 cc	24	500 cc	40°.0	—
16 cc	f	5 cc	18	100 cc	39°.9	—
»	»	»	20	»	39°.4	—
»	»	»	22	»	40°.2	—
»	»	20 cc	24	500 cc	40°.2	+
4cc	F	5 cc	6	100 cc	40°.0	—
»	»	»	8	»	39°.0	—
»	»	»	10	»	38°.4	—
»	»	20 cc	24	500 cc	37°.8	—
4 cc	F	5 cc	5	100 cc	40°.2	+
»	»	»	7	»	39°.6	+
»	»	»	9	»	39°.2	+
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.5	—
8 cc	F	5 cc	16	100 cc	39°.6	+
»	»	»	18	»	38°.8	+
»	»	20 cc	20	500 cc	40°.0	+

Resultat des ensemencements effectués 24 hs. après l'inoculation

Chéval	Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	Bouillon	Temp.	Résultat	RESUME
14	4 cc	F	20 cc	500 cc	37°.8	—	*Jusqu'à 10 cc*
14	»	»	»	»	38°.5	—	
1	5 cc	F	20 cc	500 cc	39°.6	+	T. au d. normale { cult.. . . 3 / steril. . . 0
1	8 cc	»	»	»	38°.2	—	
1	»	»	»	»	38°.8	+	T. normale . . . { cult.. . . 0 / steril. . . 4
1	»	f	5 cc	100 cc	. . .	—	
12	8 cc	F	5 cc	100 cc	38°.1	—	*De 10 à 16 cc*
9	10 cc	F	20 cc	500 cc	40°.6	+	
5	12 cc	F	5 cc	100 cc	. . .	—	T. au d. normale { cult.. . . 3 / steril. . . 0
5	»	»	»	»	40°.0	+	
12	12 cc	F	20 cc	500 cc	37°.6	—	T. normale . . . { cult.. . . 0 / steril. . . 1
12	»	»	»	»	39°.2	+	
14	12 cc	f	20 cc	500 cc	40°.0	—	*De 16 cc*
8	14 cc	F	20 cc	500 cc	36°.2	—	
2	16 cc	F	20 cc	500 cc	38°.5	+	T. au d. normale { cult.. . . 1 / steril. . . 0
5	16 cc	F	20 cc	500 cc	38°.4	+	
5	»	»	»	»	38°.5	+	T. normale . . . { cult.. . . 3 / steril. . . 1
8	16 cc	F	20 cc	500 cc	38°.4	—	
11	16 cc	f	20 cc	500 cc	. . .	—	
14	16 cc	f	20 cc	500 cc	40°.2	+	

Legende:

F - germes de forte virulence. — il n'y a pas eu de culture. S - sang.
f - germes de faible virulence. + il y a eu de culture.

O caldo que servia para a sementeira era contido em matrazes de fundo chato, de modo que o sangue semeado se depozitava em camada delgada sobre o fundo. Quando havia dezenvolvimento de cultura, as colonias aprezentavam-se de dois modos: ou apareciam como pontos brancos, em fundo vermelho, constituido pelo sangue, e que iam aumentando pouco a pouco, tendo em torno uma zona enegrecida, ou ficavam suspensas no meio da massa liquida. Nestes condições, as colonias ficavam suspensas, como pontos brancos arredondados.

As colonias eram sempre transplantadas para geloze. Dellas eram feitos dois preparados, córando-se um pela tionina e outro pelo metodo de Gram. Com a cultura obtida eram inoculados ratos e cobaias. Eram assim identificados os germens obtidos nas culturas.

Os bacilos obtidos nas culturas conservavam a mesma virulencia que os inoculados.

Dos nossos estudos tiramos as seguintes conclusões:

Le bouillon qui servait à l'ensemencement était contenu dans des fioles à fond plat, de sorte que le sang semé se déposait au fond, en couche mince. Lorsqu'il y avait un développement de culture, les colonies se présentaient sous deux aspects: tantôt elles apparaissaient comme un point blanc sur le fond rouge du sang; ce point augmentait peu à peu avec, tout autour, une région noirâtre, tantôt elles restaient suspendues au sein de la masse liquide. En se dernier cas, elles apparaissaient comme des points blancs arrondis.

Les colonies étaient toujours repiquées dans de la gélose. On en faisait deux préparations, en en colorant une avec de la thionine et l'autre par la méthode de Gram. La culture obtenue servait à inoculer des rats et des cobayes. On identifiait ainsi les germes obtenus dans les cultures.

Les bacilles obtenus dans les cultures conservaient la même virulence que les bacilles inoculés.

Em relação á permanencia do bacilo da peste no sangue do cavalo inoculado é indifferente o fator dóze, pois que, muitas vezes, apezar da inoculação de pequena quantidade os germens perzistem vivos durante muito tempo, emquanto que, apoz a inoculação de dózes maiores dezaparecem em prazo relativamente curto.

A persistencia durante 24 horas é muito comum.

A temperatura do animal não dá indicação exata da existencia ou não de bacilos da peste no sangue.

Animais cuja temperatura era normal 24 horas depois da inoculação, ainda aprezentavam em 20 cc. de sangue germens cultivaveis.

Animais cuja temperatura ainda era elevada 24 horas depois da inoculação, não mais aprezentavam em 20 cc. de sangue germens cultivaveis.

Na maioria das vezes, porém, desde que a temperatura esteja normal não ha mais germens cultivaveis.

E' pequeno o prazo de 24 horas para que seja retirado do izolamento em que se acha o cavalo que tiver sido inoculado com bacilos da peste.

Passadas 48 horas depois da inoculação, desde que a temperatura do cavalo seja normal, não ha mais bacilos da peste vivos no sangue do animal inoculado.

Nos études nous ont amenés aux conclusions suivantes:

Au point de vue de la permanence du bacille de la peste dans le sang du cheval inoculé, le facteur dose est indifférent, car, souvent, malgré l'inoculation d'une faible quantité, les germes restent longtemps en vie, au lieu que, après l'inoculation de doses plus fortes, ils disparaissaient dans un délai relativement court.

La persistance pendant 24 heures est très commune.

La température de l'animal ne révèle pas exactement s'il existe ou non des bacilles de la peste.

Des animaux dont la température etait normale 24 heures après l'inoculation présentaient encore, dans 20cc. de sang, des germes cultivables.

Des animaux dont la température etait encore haute 24 heures après l'inoculation ne présentaient plus, dans 20 cc. de sang de germes cultivables.

Toutefois, dans la plupart des cas, dès que la température etait normale, il n'y avait plus de germes cultivables.

Le délai de 24 heures est court pour retirer de l'isolement un cheval qui aura été inoculé avec des bacilles de la peste.

48 heures après l'inoculation, dès que la température du cheval est normale, il n'y a plus de bacilles de la peste dans le sang de l'animal inoculé.

Contribuições para o conhecimento da fauna indijena de Tabanidas

pelos

Drs. Adolpho Lutz e A. Neiva.

Beiträge zur Kentniss der einheimischen Tabanidenfauna

von

Dr. Adolpho Lutz e Dr. A. Neiva.

No Instituto de Manguinhos existe uma coleção de Tabánidas que pela sua maior parte consiste de especies apanhadas no Xerém por um de nós e pelo dr. Ruy Ladisláo. Contem assim principalmente fórmas dos arrabaldes do Rio de Janeiro das quais mais abaixo se dará uma lista. Quazi todas estas especies foram já encontradas em outros lugares onde as condições são semelhantes. Como mais raros póde-se mencionar a *Diatomineura exeuns* Walker e o *Tabanus aphanopterus* Wied., dos quais conhecemos a primeira de Petropolis e o segundo dos arrabaldes de S. Paulo. O aparecimento do *Tabanus importunus* Wied. no territorio do Rio de Janeiro tem interesse especial porque esta especie, comum ao Norte (Norte de Goyaz, Maranhão e Pará), parece encontrar aqui os limites meridionais do seu territorio; o mesmo se póde prezumir do *Tabanus marginatus* Macq. (*macroceratus* Bigot), fórma quazi esquecida, que se não encontra nos muzeus europeus. Foram apanhados trez exemplares em Xerém nos mezes de Fevereiro, Março e Abril. (Recentemente obtivemos 3 femeas desta especie de Ubatuba e de Sabaúna no Estado de S. Paulo e de Itaguahy no Estado do Rio de Janeiro.)

Na coleção acham-se tambem umas mutucas colhidas em Barbacena (Minas Geraes)

In dem «Instituto de Manguinhos» befindet sich eine Sammlung von Tabaniden, die zum grösseren Teile in Xerém von einem von uns und Dr. Ruy Ladisláo zusammengebracht wurde. Dieselbe enthält demgemäss hauptsächlich Formen aus der Umgegend von Rio, von denen weiter unten ein Verzeichniss gegeben werden soll. Es handelt sich fast durchwegs um Arten, die auch anderswo unter ähnlichen Verhältnissen beobachtet worden sind. Als etwas seltener wären *Diatomineura exeuns* Walker und *Tabanus aphanopterus* Wied. anzuführen, erstere uns schon von Petropolis, letztere aus der Umgegend von S. Paulo bekannt. Besonders interessant ist aber das Vorkommen von *Tabanus importunus* Wied. im Gebiete von Rio de Janeiro, der zwar im Norden (Nord-Goyaz, Maranhão und Pará) gemein ist, hier aber bereits an der südlichen Grenze seiner Verbreitung angelangt sein dürfte. Dasselbe gilt auch von *Tabanus marginatus* Macq. (*macroceratus* Bigot), einer ganz verschollenen Form, die in europäischen Museen kaum zu finden ist. Es wurden in Xerém drei Exemplare in den Monaten Februar, März und April erbeutet. (Neuerdings erhielten wir drei Weibchen dieser Art von Ubatuba und Sabaúna im Staat S. Paulo und Itaguahy im Staat Rio de Janeiro.)

In der Sammlung befinden sich ausserdem

pelo dr. Belisario Penna, entre as quais ha duas especies novas de *Erephopsis (Pangoninae)* que descreveremos com os nomes de *auricincta* e *nubiapex.*

Ha pouco tempo a coleção recebeu uma contribuição importante constituida por cerca de 200 Tabánidas, colecionados pelos drs. Fernando Soledade e Mauricio de Abreu no Estado de Minas, entre Theophilo Ottoni e as marjens do Rio Doce. E' esta zona coberta de mata virgem continua e a sua altura acima do nivel do mar varia de 160 a 300 metros; em relação á fauna de dipteros póde ser considerada terreno ainda completamente inexplorado.

Podia-se prever o aparecimento de especies novas porque a zona é situada bastante para o norte do Rio de Janeiro, cuja fauna, assim como a do Amazonas, é das mais conhecidas. Desta ultima havia que esperar já algumas especies; de outro lado, podia-se contar com outras, anteriormente descritas do Brazil sem mais indicação e que depois não foram mais encontradas, e principalmente com umas especies inteiramente novas, visto que entre as poucas mutucas procedentes do mesmo estado já achamos varias novidades. Esta esperança se realizou; encontrámos de especies novas uma *Erephopsis,* uma *Esenbeckia* e algumas especies de *Tabanus* maiores e menores, e finalmente mutucas que já tinhamos do Pará e de outros lugares, mas que não haviam sido descritas ainda. Mais abaixo daremos um catalogo das especies.

Finalmente o Instituto tambem recebeu algumas mutucas do Estado de Matto Grosso trazidas pelo farmaceutico Cesar Diogo Filho. Ao lado de algumas *Lepidoselaga lepidota* Wied. e de dois exemplares de especie vizinha ao *Tabanus comitans* Wied., foi encontrado um *Diachlorus* que não combina com qualquer das especies descritas como *Diachlorus,* mas sim com o *Chrysops bipunctatus* Wied.

Damos aqui a lista dos Tabánidas colecionados no Estado do Espirito Santo. Os exemplares com poucas exceções eram bastante, alguns até muito bem conservados; eram todos femeas.

einige von Dr. Belisario Penna in Barbacena (Minas Geraes) gesammelte Tabaniden und darunter zwei neue *Erephopsisarten (Pangoninae),* die wir als *E. auricincta* und *nubiapex* beschreiben werden.

Vor Kurzem erhielt die Sammlung einen wichtigen Beitrag in der Form von circa 200 Tabaniden, welche von den Drs. Fernando Soledade und Mauricio de Abreu im Staate Espirito Santo, zwischen Theophilo Ottoni und dem Rio Doce gesammelt wurden. Diese Zone ist von zusammenhängendem Urwald bedeckt und wechselt in ihrer Höhe über dem Meeresspiegel zwischen 160 und 300 Meter; in Beziehung auf ihre Dipterenfauna kann sie als völlig unerforschtes Terrain gelten.

Man konnte voraussehen, dass neue Arten auftreten würden, da diese Zone ziemlich nördlich von Rio de Janeiro liegt, dessen Fauna, neben der des Amazonengebietes, am besten bekannt ist. Aus letzterem liess sich eine Anzahl von Arten erwarten, aber andererseits konnte man auch auf solche hoffen, die ohne Ortsangabe früher aus Brasilien beschrieben und seither nicht mehr gefunden wurden, ganz besonders aber auch auf ganz neue Arten, da unter den wenigen, im selben Staate gesammelten Tabaniden verschiedene Novitäten vorkommen. Diese Erwartung hat sich erfüllt; wir fanden von neuen Arten eine *Erephopsis,* eine *Esenbeckia* und einige grössere und kleinere Tabanusarten, ausserdem auch Arten, die wir von Pará und anderen Orten besassen, die aber noch nicht beschrieben sind. Weiter unten geben wir einen Katalog der Arten.

Endlich erhielt das Institut auch einige vom Apotheker Cesar Diogo Filho mitgebrachte Bremsen aus dem Staate Matto Grosso. Neben einigen *Lepidoselaga lepidota* Wied. und zwei Exemplaren einer dem *T. comitans* Wied. nahestehenden Arten fand sich auch ein *Diachlorus,* der mit keiner der beschriebenen Arten übereinstimmte, wohl aber mit dem *Chrysops bipunctatus* Wied.

Wir geben hier die Liste der im Staate Espirito Santo gesammelten Tabaniden; die Exemplare waren mit wenigen Ausnahmen genügend, teilweise sogar sehr gut erhalten. Es waren lauter Weibchen.

Lista das especies de Tabánidas colecionados no Estado de Espirito Santo:

1.	Lepidoselaga lepidota Wied.	34
2.	Tabanus miles Wied.	32
3.	» macroceratus Bigot.	21
4.	*Esenbeckia neglecta* n. sp.	15
5.	Tabanus modestus Wied.	11
6.	Diachlorus bivittatus Fabr.	11
7.	Tabanus taeniotes Wied.	8
8.	Dichelacera alcicornis Wied.	6
9.	Tabanus fuscus Wied.	6
10.	Dichelacera januarii Wied.	5
11.	Tabanus quadripunctatus Fabr.	5
12.	» vestitus Wied.	5
13.	» *nigristrigma* n. sp.	5
14.	» leucaspis Wied.	4
15.	» guttipennis Wied.	3
16.	» *subniger* n. sp.	3
17.	*Erephopsis soledadei* n. sp.	3
18.	Tabanus unicolor Wied.	2
19.	» *scriptipennis* n. sp.	2
20.	Erephopsis sorbens Wied.	2
21.	Chrysops laetus Wied.	2
22.	Acanthocera longicornis Fabr.	2
23.	Tabanus triangulum Wied.	2
24.	Esenbeckia bahiana Bigot.	1
25.	Erephopsis tabanipennis Macq.	1
26.	*Tabanus imitator* n. sp.	1
27.	» aurora Macq.	1
28.	» sorbillans Wied.	1
29.	» mexicanus L.	1
30.	» fuscipennis Wied.	1
31.	» cinereus Wied.	1
32.	» *anonymus* n. sp.	1
33.	Chrysops costatus Fabr.	1
34.	» molestus Wied.	1
35.	Tabanus limpidapex Wied.	1
	Total	201

Lepidoselaga lepidota Wied. é especie commum nas partes mais quentes do Brazil, mórmente nos Estados situados para o nórte do tropico. O mesmo se póde dizer do *Tabanus modestus, T. triangulum* e *Chrysops laetus,* achando-se o *T. leucaspis* na mesma zona, porém mais raramente; um de nós encontrou todas estas especies no Estado de S. Paulo, como no do Pará. O *T. unicolor* tem a mesma distribuição e parece tor-

Verzeichniss der im Staate Espirito Santo gesammelten Tabaniden:

1.	Lepidoselaga lepidota Wied.	34
2.	Tabanus miles Wied.	32
3.	» mocroceratus Bigot.	21
4.	*Esenbeckia neglecta* n. sp.	15
5.	Tabanus modestus Wied.	11
6.	Diachlorus bivittatus Fabr.	11
7.	Tabanus taeniotes Wied.	8
8.	Dichelacera alcicornis Wied.	6
9.	Tabanus fuscus Wied.	6
10.	Dichelacera januarii Wied.	5
11.	Tabanus quadripunctatus Fabr.	5
12.	» vestitus Wied.	5
13.	» *nigristigma* n. sp.	5
14.	» leucaspis Wied.	4
15.	» guttipennis Wied.	3
16.	» *subniger* n. sp.	3
17.	*Erephopsis soledadei* n. sp.	3
18.	Tabanus unicolor Wied.	2
19.	» *scriptipennis* n. sp.	2
20.	Erephopsis sorbens Wied.	2
21.	Chrysops laetus Wied.	2
22.	Acanthocera longicornis Fabr.	2
23.	Tabanus triangulum Wied.	2
24.	Esenbeckia bahiana Bigot.	1
25.	Erephopsis tabanipennis Macq.	1
26.	*Tabanus imitator* n. sp.	1
27.	» aurora Macq.	1
28.	» sorbillans Wied.	1
29.	» mexicanus L.	1
30.	» fuscipennis Wied.	1
31.	» cinereus Wied.	1
32.	» *anonymus* n. sp.	1
33.	Chrysops costatus Fabr.	1
34.	» molestus Wied.	1
35.	Tabanus limpidapex Wied.	1
	Total	201

Lepidoselaga lepidota Wied. ist eine in den wärmeren Teilen Brasiliens, besonders in den nördlich vom Wendekreis gelegenen Staaten, gemeine Art. Dasselbe kann man von *Tabanus modestus, T. triangulum* und *Chrysops laetus* sagen, während *Tabanus leucaspis* eben daselbst, aber seltener vorkommt. Einer von uns fand diese Arten sowohl im Staate S. Paulo, als in demjenigen von Pará. Der *Tabanus unicolor* hat dieselbe Verbreitung und

nar-se mais frequente em direção ao Norte, mas como elle prefere o crepusculo (e isto acontece tambem com o *T. mexicanus*), é só possivel apanhal-o em certas horas. *T. mexicanus, T. quadripuntactus* e *C. costatus* têm distribuição ainda mais vasta e são especies comuns.

O interesse principal cabe ás especies que até hoje só conhecemos dos Estados de S. Paulo e Rio de Janeiro e dos lugares mais vizinhos como o *T. taeniotes, Dichelacera alcicornis, D. januarii, T. guttipennis, Erephopsis tabanipennis, T. aurora, T. fuscipennis, Erephopsis sorbens* de um lado e aquelles do outro lado que só eram conhecidos do Nórte, como o *T. vestitus* Wied. e o *T. cinereus* e *Esenbeckia bahiana,* descritos de exemplares colhidos na Bahia. O *Diachlorus bivittatus* até hoje só se conhecia dos arrabaldes do Rio, emquanto que o *T. fuscipennis* e *T. limpidapex* se encontram, tanto aqui como nas serras de S. Paulo.

Restam ainda algumas especies que parecem ter o principal centro de distribuição no Estado de Minas e entre ellas algumas novas. Conhecemos o *T. miles* de Petropolis e do Estado de Goyaz; o *T. macroceratus* até ha pouco só se conhecia do Xerém, onde todavia é raro. O grande numero de exemplares (21) existentes na coleção mostra que é frequente naquella zona. Na mesma se encontra outra especie semelhante, porém nova, o *T. nigristigma.* Outras especies novas são *Esenbeckia neglecta,* que lembra a *Esenbeckia fasciata,* uma *Erephopsis (soledadei),* que se parece com a *nigricans* n. sp. do Estado de Espirito Santo; finalmente algumas especies menores em parte vizinhas ao *T. tœniotes.*

scheint nach dem Norden zu immer häufiger zu werden; weil er aber, ebenso wie *Tabanus mexicanus,* die Dämmerung liebt, wird er gewöhnlich nur zu bestimmten Stunden gefangen. *T. mexicanus, T. quadripunctatus* und *Ch. costatus* haben ein noch weiteres Verbreitungsgebiet und sind gemeine Arten.

Das Hauptinteresse liegt in solchen Arten, welche wir bisher nur aus den Staaten São Paulo und Rio de Janeiro oder deren nächsten Nachbarschaft kannten, wie *T. taeniotes, Dichelacera alcicornis, D. januarii, T. guttipennis, Erephopsis tabanipennis, T. aurora, T. fuscipennis, Erephopsis sorbens* einerseits und andererseits denjenigen, die nur ganz aus dem Norden bekannt waren, wie *T. vestitus* Wied. und den aus Bahia beschriebenen *T. cinereus* und *Esenbeckia bahiana. Diachlorus bivittatus* war bisher nur aus der Gegend von Rio bekannt, während *T. fuscipennis* und *T. limpidapex* ebendaselbst und in den Bergketten von S. Paulo vorkommen.

Es bleiben noch einige Arten, die in Minas ihr Hauptverbreitungscentrum zu haben scheinen, worunter auch einige neue. *T. miles* kennen wir von Petropolis und dem Staate Goyaz, während für *T. macroceratus* bis vor kurzem nur Xerém (Staat Rio) als Fundort bekannt war, woselbst er aber selten ist. Dagegen ersieht man aus der grossen Zahl der Exemplare (21) der Sammlung, dass er in jener Zone häufig vorkommt. Daselbst findet sich noch eine ähnliche, aber neue Art, *T. nigristigma.* Andere neue Arten sind *Esenbeckia neglecta*, die an *E. fasciata* erinnert; eine *Erephopsis (soledadei),* die der *nigricans* n. sp. aus Espirito Santo ähnlich sieht; endlich kleine Arten, die zum Teil dem *T. taeniotes* nahestehen.

Lista dos tabánidas colecionados no Xerém de Fevereiro 1907 até Fevereiro 1908.

(Verzeichniss der in Xerém vom Februar 1907 bis Februar 1908 gesammelten Arten.)

1. Erephopsis sorbens Wied.
2. » winthemi Wied.
3. » leucopogon Wied.
4. Bombylopsis (n. gen.) nitens Bigot.
5. Diatomineura tabanipennis Macq.
6. » exeuns Walker.
7. Esenbeckia fuscipennis Wied. (Typus et var.)
8. Chrysops costatus Fabr.
9. » leucospilus Wied.
10. » laetus Wied.

11. Diachlorus bivittatus Fabr.
12. Lepidoselaga lepidota Wied.
13. Dichelacera alcicornis Wied.
14. » januarii Wied.
15. » flava Wied.
16. » immaculata Macq.
17. » fuscipennis Macq.
18. Tabanus macrodonta Macq.
19. » aurora Macq.
20. » impressus Wied.
21. » cinerarius Wied.
22. » triangulum Wied.
23. » modestus Wied.
24. » trivittatus Fabr.
25. » trilineatus Latr.
26. » obsoletus Wied.
27. » planiventris Wied.
28. » litigiosus Walker
29. » quadripunctatus Fabr.
30. » maculipennis Macq.
31. » punctipennis Macq.
32. » mexicanus L.
33. » leucaspis Wied.
34. » marginatus Macq.
35. » aphanopterus Wied.
36. » fuscus Wied.

Acrecentamos mais trez especies achadas mais tarde entre o material colhido em Xerém:

In dem in Xerém gesammelten Material wurden noch nachträglich folgende drei Arten aufgefunden:

37. Diachlorus distinctus Lutz.
38. Stibasoma thiotaenia Wied.
39. Tabanus scythropus Wied.

Lista de outros Tabánidas da coleção de Manguinhos encontrados no litoral do Rio de Janeiro.

(Verzeichniss anderer Tabaniden aus der Sammlung von Manguinhos, welche im Küstengebiet von Rio de Janeiro vorkommen.)

1. Erephopsis fulvithorax Wied.
2. » venosa Wied.
3. Erephopsis nigripennis Guérin
4. Acanthocera longicornis Macq.
5. Tabanus viridiventris Wied.
6. » importunus Wied.
7. » comitans Wied.

Lista de outros Tabánidas da coleção de Manguinhos colecionados no Estado de Minas.

(Verzeichniss der andern im Staat Minas gesammelten Tabaniden aus der Sammlung in Manguinhos.)

1. *Erephopsis auricincta* n. sp., Barbacena.
2. » *nubiapex* n. sp., Barbacena.
3. » winthemi Wied., Juiz de Fóra.
4. » sorbens Wied.
5. » xanthopogon Macq.
6. Bombylopsis nov. gen. analis Fabr. (?) Barbacena.
7. » nov. gen. leonina n. sp., Barbacena.
8. Esenbeckia ferruginea Macq., Bicudos.
9. Chrysops fusciapex n. sp., Barbacena.
10. » laetus Wied., Barbacena.
11. » molestus Wied., Barbacena.
12. » costatus Fabr., Juiz de Fóra.
13. » Selasoma tibiale Wied., Lassance.
14. Tabanus aurora Macq.
15. » monochroma Wied., Barbacena.
16. » fuscipennis Wied., Barbacena.
17. » leucaspis Wied., Bicudos.
18. » punctipennis Macq., Juiz de Fóra.

As novas denominações de generos e especies não escritas em italico já foram anteriormente estabelecidas por um de nós (Lutz).

Die nicht in Cursiv gedruckten neuen Genus- und Speciesnamen wurden schon früher von einem von uns (Lutz) aufgestellt.

Sobre a Amœba diplomitotica n. sp.

Contribuição para o estudo da divizão nuclear nas amebas

pelo

Dr. H. de Beaurepaire Aragão,

Assistente do Instituto

(Estampa 2)

Ueber eine neue Amoebenart, Amoeba diplomitotica.

Beitrag zum Studium der Kernteilung bei den Amoeben

von

Dr. H. de Beaurepaire Aragão,

Assistenten am Institut

(Tafel 2)

Entre as diferentes amebas de agua doce que, nestes ultimos tempos, tivemos ocazião de observar no Instituto, uma se nos deparou, com um processo de divizão bastante curiozo que procurámos observar por menor, sem esquecer tambem outras questões referentes á sua morfologia e biolojia. Aprezentamos, a seguir, o rezultado de nossas pesquizas sobre o assunto.

A *Amœba diplomitotica* prolifera muito bem, em geral, tanto nas cubas de cultura assim como nos meios artificiais liquidos ou solidos; nestes, porem, sua vejetação, embora abundante não dá logar ao aparecimento de formas tão dezenvolvidas e de estrutura tão nitida como nos meios liquidos, além de que o enquistamento, muito mais precoce, apressa tambem as fazes de vejetação da ameba, impedindo a boa observação dellas.

Nas infuzões vejetais, principalmente naquellas em que a prezença de paramecios diminue a quantidade de bacterios, em certa proporção, é que a ameba encontra as melhores condições de proliferação.

Desde que em uma cultura as amebas proliferam em abundancia, convem observal-as seguidamente, quer a fresco, quer em pre-

Unter den verschiedenen Süsswasseramoeben, welche wir in letzter Zeit in diesem Institute zu beobachten Gelegenheit hatten, kam uns eine vor, deren Teilungsprozess ziemlich merkwürdig ist, weshalb wir ihn eingehend zu beobachten versuchten, wobei wir auch die anderen Fragen der Morphologie und Biologie nicht ausser Acht liessen. Wir geben nachstehend die Resultate unserer einschlägigen Untersuchungen:

Die *Amoeba diplomitotica* vermehrt sich im Allgemeinen sehr gut, sowohl in den Kulturgläsern, als in den verschiedentlichen künstlichen, flüssigen und festen Nährmedien. Auf letzteren giebt sie jedoch, trotz reichlichen Wachsthums, keine so deutlichen Entwicklungs- und Strukturformen, als in flüssigen Kulturmedien, abgesehen davon, dass die viel frühzeitigere Incystierung auch die Vegetationsformen der Amoeben beschleunigt und so eine gute Beobachtung derselben hindert.

Nur in vegetabilischen Infusionen, besonders solchen, bei welchen die Gegenwart von Paramaecien die Bacterienmengen einigermassen beschränkt, findet die Amoebe die günstigsten Existenzbedingungen. Sobald sich in einer Kultur die Amoeben reichlich vermeh-

parados fixados e córados, para que se possa surpreender as fazes interessantes do seu ciclo e, principalmente aquellas que se referem á divizão nuclear. A tecnica mais recomendavel para a confecção de preparações fixadas e vantajozas ao estudo é a de se fazerem preparados totais sobre laminula e o emprego do processo humido de Schaudinn, seguido de coloração pelo metodo de Heidenhain com a hematoxilina ferrea.

Morfolojia e biolojia: A forma da ameba, quando em repouzo, é arredondada aprezentando ella então de 20 a 30 *mikra* de diametro. Desde, porem, que entra em movimento toma configuração mais variada pela constante emissão de pseudopodios em uma ou outra porção do seu corpo. Estes pseudopodios que são unicos, de egual largura e comprimento que o resto do corpo da ameba e, neste cazo, quazi sempre unicos, ou então são estreitos, longos, multiplos, assestando-se em qualquer ponto, não raro tomando dispozição radiada em torno ao endoplasma do protozoario. Quer uns quer outros são, ao se formarem, apenas constituidos por ectoplasma; o endoplasma nelles penetra só depois de perfeitamente constituidos.

Os pseudopodios formam-se sucessivamente, com pequeno intervalo, permitindo á ameba rapido deslocamento, quer numa só direção, quando se formam sucessivamente no mesmo ponto, quer alterando a quazi todo o instante a orientação do movimento pela emissão de prolongamentos sem a mesma regularidade de localização.

Estando a ameba em movimento, com a formação de pseudopodios e a penetração nelles do endoplasma se dá a constante deslocação dos elementos nelle contidos, nucleos, vacuolos, incluzões etc.

O protoplasma da ameba é fluido, nelle se distingue ectoplasma hialino e um endoplasma, pouco refrinjente, alveolarmente estruturado no qual se veem granulações diversas, bacterios, vacuolos dijestivos e pulsateis e o nucleo.

Os bacterios existem, ás vezes, em grande abundancia e tem o aspeto de pequenos corpusculos e massas refrinjentes.

ren, ist es geboten, dieselbe anhaltend, teils in frischen, theils in fixierten und gefärbten Präparaten zu verfolgen, um die interessanten Phasen ihres Entwicklungszyklus ertappen zu können, ganz besonders diejenigen, welche sich auf die Kernteilung beziehen. Die empfehlenswerteste Technik für die Herstellung günstiger Präparate besteht in der Anwendung von Deckglaspräparaten, welche nach der feuchten Methode, von SCHAUDINN fixirt und mit HEIDENHAIN'schem Eisenhaematoxylin gefärbt werden.

Morphologie und Biologie: In Ruhe hat die Amoebe eine rundliche Form und einen Durchmesser von 20—30 Mikra; sobald sie sich indessen in Bewegung setzt, nimmt sie die verschiedensten Formen an, indem sie beständig von irgend einem Teile ihres Körpers Pseudopodien aussendet. Diese sind entweder von gleicher Länge und Breite, als der Rest des Leibes, und dann fast immer in der Einzahl, oder schmal, lang und in Mehrzahl, indem sie an irgend einer Stelle auftreten und sich nicht selten strahlenförmig um das Endoplasma der Amoebe gruppiren. Die einen, wie die andern, bestehen bei ihrer Bildung nur aus Ectoplasma und das Endoplasma dringt in dieselben erst nach ihrer völligen Ausbildung. Die Pseudopodien bilden sich successiv mit kurzen Intervallen, wobei sich die Amoebe rasch fortbewegt, entweder in einer Richtung, wenn dieselben fortwährend am selben Punkte auftreten, oder unter fortwährender ändernder Orientirung, wenn die Aussendung der Fortsätze ohne solche regelmässige Lokalisation stattfindet. Bewegt sich die Amoebe unter Bildung von Pseudopodien und Eindringen des Endoplasmas in dieselben, so erfolgt eine konstante Dislokation der darin enthaltenen Elemente, Kern, Vacuolen, Einschlüsse etc.

Das Protoplasma der Amoebe ist flüssig und man unterscheidet darin ein hyalines Ectoplasma und ein wenig lichtbrechendes Endoplasma von alveolärer Structur, in dem sich verschiedene Granulationen, Bacterien, verdauende und pulsirende Vacuolen und der Kern erkennen lassen. Bacterien sind manchmal in grosser Anzahl vorhanden und erschei-

Os vacuolos dijestivos aparecem sob a forma de pequenas zonas claras no interior das quais se vê muito frequentemente substancia em via de ser dijerida.

Quanto aos vacuolos pulsateis são elles multiplos, raramente menos de 3 ou mais de 7; um delles aprezenta volume muito maior que qualquer dos outros. Desde que este grande vacuolo pulsa, dous dos menores fundidos e, que tem por isso adquirido maior volume vem substituir o que dezapareceu, ao passo que outros vacuolos menores vão surjindo. O vacuolo maior existente no endoplasma, geralmente nelle ocupa as mais variadas pozições e n'elle se desloca a cada momento, ao passo que os vacuolos menores se deparam agrupados, quazi sempre em um só ponto, que é a porção posterior do corpo da ameba, durante o movimento.

O nucleo da *Amœba diplomitotica* é veziculozo; a fresco, aparece como pequena massa circular de contornos nitidos, de 3 a 4 *mikra* de diametro, menos refrinjente que o endoplasma que o cerca.

Examinado com maior individuação e em preparações bem coradas verifica-se que é constituido por membrana nitida duplamente contornada, a cuja face interna se aplicam numerozas pequenas massas de cromatina, ligadas umas a outras por delgados filamentos acromaticos. A esta camada de cromatina se segue uma zona circular de substancia acromatica cujo interior é ocupado por grande cariozoma no interior do qual ainda se pode distinguir nas preparações a fresco, ou nas bem diferenciadas, um pequeno centriolo. A estrutura do cariozoma não é homojenea, nelle se podem distinguir duas substancias diversas, uma de natureza plastinica e outra com carateres de cromatina que se acha distribuida sobre a primeira, sob a forma de pequenas massas de colorido mais carregado. Est. 2, fig. 1.

Esboçada a morfolojia da ameba e principalmente a de seu nucleo passemos a tratar da divizão nuclear que se processa debaixo de aspeto bastante curiozo, e creio, pelo menos até certo ponto, inedito.

nen als kleine, lichtbrechende Körperchen. Die Verdauungsvacuolen erscheinen in der Form kleiner heller Stellen, in deren Innern man öfters Substanzen findet, welche eben der Verdauung unterliegen.

Die pulsierenden Vacuolen existieren in der Mehrzahl, selten weniger als drei, oder mehr als sieben; eine derselben bietet ein viel grösseres Volumen, als irgend eine der anderen. Sobald eine dieser Vacuolen pulsiert, treten zwei kleinere, die sich vereinigt und dadurch an Volum gewonnen haben, an ihre Stelle, während andere kleinere Vacuolen auftreten. Die grösste Vacuole, welche im Endoplasma existiert, kann in demselben die verschiedensten Stellen einnehmen und verschiebt sich fortwährend, indessen die kleineren Vacuolen in Gruppen auftreten und zwar gewöhnlich in einem Punkte, welcher bei den Bewegungen den hintersten Teil des Amoebenkörpers bildet.

Der Kern der *Amoeba diplomitotica* ist blasig; frisch erscheint er als kleine, runde, scharf umschriebene Masse von 3—4 Mikra Durchmesser und ist weniger lichtbrechend als das Endoplasma, welches ihn umgiebt. Bei eingehender Untersuchung und in gefärbten Präparaten konstatirt man, dass er aus einer deutlichen, doppelt kontourirten Membran besteht, an deren Innenseite zahlreiche kleine Chromatinmassen liegen, welche miteinander durch dünne achromatische Filamente verbunden sind. Auf diese Schicht von Chromatin folgt eine Zone von Kreisen achromatischer Substanz, deren Inneres von einem grossen Caryosom eingenommen wird, in welchem man noch in frischen oder gut differenzierten Präparaten ein kleines Centriol unterscheiden kann. Die Struktur des Caryosoms ist nicht homogen, vielmehr kann man in demselben zwei verschiedene Substanzen unterscheiden, eine von Plastinnatur und eine andere mit den Charakteren des Chromatins, welche in der Form kleiner, stärker gefärbter Massen auf der ersteren verteilt ist. Tafel 2 Fig. 1.

Nachdem wir so die Morphologie der Amoebe und besonders ihres Nucleus dargestellt haben, wollen wir uns mit der Kernteilung befassen, welche ein ziemlich eigentüm-

A maioria dos processos de divizão assinalados para as amebas até hoje conhecidas é a da amitoze; ja existe, porem, um pequeno grupo desses protozoarios em que se tem assinalado a existencia de divizão carioquinetica, se bem que ainda evoluindo de modo um tanto primitivo.

A primeira menção de processo de divizão indireta nas amebas deve-se a Schaudinn (1) que a observou na *Amœba binucleata.* Algum tempo depois Awerinzew (2) verificou egualmente o mesmo tal processo na *Amœba proteus.*

Ulteriormente Vahlkampf (3) descreveu, na *Amœba limax,* um processo de divizão mitozica, mais tipico que os precedentes, caraterisado pela formação de placas polares, pela divizão do cariozoma e pelo aparecimento sobre os filamentos acromaticos que uniam essas placas de 3 cromozomios que depois se dividiam e se dirijiam para as placas polares onde, juntamente com ellas, rejeneravam os novos nucleos.

Prowazek, (4) e Leyden Löwenthal (5) assinalam na *Amœba buccalis* a existencia de mitoze primitiva.

Wenyon, (6) na *Amœba muris,* tambem conseguiu observar algumas fazes em que se percebe a divizão mitozica dessa ameba.

Mais recentemente, Doflein (7) assinalou, na *Amœba vespertilio,* a existencia de divizão indireta. Todavia porém, na *Amœba buccalis,* e nesta ultima, a carioquineze se manifesta no cariozoma, ao passo que os elementos do trofo-nucleo se dividem amitozicamente.

A *Amœba diplomitotica* aprezenta um processo de divizão indireta que se manifesta de dous modos diversos.

Uma das variedades no processo de divizão da ameba é caraterizado pela existencia de mitoze dupla do cariozoma e dos elementos do trofo-nucleo; a outra assinala-se pela divizão direta do cariozoma e indireta do trofo-nucleo.

Vejamos cada um dos processos de per-si, a começar pelo de dupla mitoze.

liches und, wie ich glaube, wenigstens teilweise, noch unbeschriebenes Bild bietet.

Die Mehrzahl der von Amoeben berichteten Teilungsprozesse gehört zur Amitose; es existiert nur eine kleine Gruppe dieser Protozoen, bei welchen das Vorhandensein einer caryocinetischen Teilung angegeben ist, die sich übrigens in ziemlich primitiver Weise abspielt.

Die erste Erwähnung eines indirekten Teilungsprozesses bei den Amoeben verdanken wir SCHAUDINN, (1) der denselben bei der *Amoeba binucleata* beobachtete. Einige Zeit später stellte AWERINZEW (2) ebenfalls das Vorkommen eines solchen Prozesses bei der *Amoeba proteus* fest. Später beschrieb VAHLKAMPF (3) bei der *Amoeba limax* einen mitotischen Kernteilungsprozess, der typischer als die vorstehenden ist. Derselbe kennzeichnet sich durch die Bildung von Polplatten, die Teilung des Caryosoms und das Auftreten von drei Chromosomen auf den achromatischen Filamenten, welche die Polplatten verbinden; diese teilen sich darauf und begeben sich zu den Polplatten, um, zusammen mit diesen, die neuen Amoebenkerne zu bilden.

PROWAZEK (4) und LEYDEN-LÖWENTHAL (5) geben bei der *Amoeba buccalis* dle Existenz einer primitiven Mitose an. Auch WENYON (6) gelingt es bei der *Amoeba muris* einige Phasen zu beobachten, aus welchen man die mitotische Teilung dieser Amoebe erkennt.

Neuerdings teilte DOFLEIN (7) das Vorkommen der indirekten Teilung bei *Amoeba vespertilio* mit; jedoch sowohl bei dieser, als bei der *Amoeba buccalis* zeigt sich die Caryocinese am Caryosom, während sich die Elemente des Aussennucleus amitotisch teilen.

Die *Amoeba diplomitotica* zeigt einen indirekten Teilungsprozess, der sich auf zwei verschiedene Weisen äussert. Eine derselben kennzeichnet sich durch die Existenz einer doppelten Mitose des Caryosoms und der Elemente des Aussenkerns; die andere äussert sich durch eine direkte Teilung des Caryosoms und eine indirekte des Aussennucleus. Wir betrachten nun beide Prozesse und beginnen mit demjenigen der doppelten Mitose.

Dieser Teilungsprozess ähnelt demjenigen sehr, den wir bei der *Polytomella agilis* be-

Este processo de divizão muito se assemelha áquelle que assinalaremos para a *Polytomella agilis*. Sua primeira faze carateriza-se pela fragmentação do cariozoma da ameba e pela dispozição radiaria que, em torno delle, tomam os elementos do nucleo exterior. Est. 2, fig. 2.

Em seguida os cromozomios do cariozoma, orientados pelos dous centriolos orijinarios da divizão do primitivo do nucleo, na faze precedente, começam a se separar em dous grupamentos opostos, ao mesmo tempo que os cromozomios do nucleo exterior se deslocam para os lados do cariozoma, já então um pouco alongado e ahi se agrupam circumdando-o. Est. 2, fig. 3.

Em faze mais adiantada os cromozomios do cariozoma aparecem separados em dous grupamentos nitidos, ligados um ao outro por delicados filamentos acromaticos e pelo filamento de união dos centriolos, geralmente bastante vizivel. Os cromozomios do nucleo exterior precedentemente colocados em torno do cariozoma, vêm-se dispor, então, no espaço que fica entre os dous grupos de cromozomios do cariozoma, tomando aí uma dispozição quazi perpendicular ao maior eixo da figura de divizão.

Já então a membrana nuclear dezapareceu por completo e a figura de divizão aparece no interior de um espaço claro sem limites nitidos. Est. 2, fig. 4.

As fazes seguintes do processo são assinaladas pelo afastamento progressivo dos grupamentos de cromozomios do cariozoma que passam a constituir, nos extremos da zona de divizão, duas placas polares lijeiramente concavas, internamente, nas quais se pode observar, ás vezes, com muita nitidez um centriolo ligado ao do lado oposto por filamento intermediario sempre bastante distinto — Os filamentos acromaticos e os cromozomios do nucleo exterior não aprezentam alterações sensiveis, apenas aquelles se tornaram mais longos. Est. 2, fig 5 e 6.

Continuando o afastamento das placas polares, observam-se certas modificações na figura de divizão; toma o aspeto de fuzo

schreiben werden. Seine erste Phase charakterisiert sich durch die Fragmentirung des Caryosoms der Amoebe und durch die radiäre Anordnung der Elemente des Aussennucleus um dieselbe. (Tafel 2 Fig. 2). Hierauf beginnen die Chromosomen des Caryosoms, orientiert durch die zwei Centriolen, welche in der vorhergehenden Phase durch die Teilung des ursprünglich im Kerne vorhandenen entstehen, sich in zwei entgegengesetzte Gruppen zu teilen, während die Chromosomen des Aussennucleus sich nach dem, schon jetzt etwas verlängerten, Caryosoma begeben und sich um dasselbe gruppiren. (Tafel 2 Fig. 3). In einer mehr vorgeschrittenen Phase erscheinen die Chromosomen des Caryosoms in zwei deutliche Gruppen getrennt, welche unter sich durch zarte achromatische Filamente und den, gewöhnlich deutlich sichtbaren, Verbindungsfaden der Centriolen im Zusammenhang stehen. Die vorher um das Caryosom gelagerten Chromosomen des Aussennucleus rücken nun nach dem freien Raume, welcher zwischen den beiden Gruppen der Chromosomen des Caryosoms bleibt und ordnen sich dort fast senkrecht zur grössten Axe der Teilungsfigur.

Schon jetzt verschwinden die Kernmembranen fast völlig und die Teilungsfiguren erscheinen im Innern eines hellen Raumes, der keine deutliche Begrenzung zeigt. (Tafel 2 Fig. 4).

Die weiteren Phasen des Prozesses kennzeichnen sich durch fortschreitende Entfernung der Chromosomengruppen des Caryosoms, welche allmälich an den Enden der Trennungszone zwei, nach innen leicht konkave Polplatten bilden, in deren Innern man oft sehr deutlich ein Centriol erkennt, welches mit demjenigen der anderen Seite durch einen, immer sehr deutlichen, Verbindungsfaden zusammenhängt. Die achromatischen Filamente und die Chromosomen des Aussennucleus zeigen keine deutlichen Veränderungen, nur werden jene etwas länger. (Tafel 2 Fig. 5, 6). Während die Entfernung der Polplatten weiter geht, beobachtet man gewisse Modifikationen der Teilungsfigur; sie nimmt die Form einer länglichen Spindel an und auf den die

alongado e sobre os filamentos que unem as placas polares aparecem espalhadas, ocupando-os em quazi toda a extensão os cromozomios do nucleo exterior que precedentemente tomavam a dispozição anular em torno do maior eixo da zona nuclear. Est. 2, fig. 7.

Não tarda, porém, que o aspeto precedente se modifique, e continuando o afastamento das placas polares toma a figura de divizão certa conformação cilindrica, com o aspeto de um chouriço, mantendo-se porém a mesma a dispozição dos cromozomios do nucleo externo sobre os filamentos acromaticos. Est. 2, fig. 8.

Atinjido este periodo, pode se dizer que se está na metafaze do processo de divizão; daqui em diante tende tudo á constituição dos nucleos secundarios.

Observa-se então, como primeiro indicio do novo curso que vai tomar o processo, o estreitamento da figura precedente na parte media do seu comprimento, ao mesmo tempo que os cromozomios que aí se achavam se afastam para um lado e para outro e vão constituir dous agrupamentos conicos opostos pelos vertices e com bazes voltadas para as placas polares, de que são separados por pequena zona clara, separada por filamentos acromaticos atravessando, de um lado a outro, a zona estreitada. Vê-se o filamento de união dos centriolos. Est. 2, fig. 9.

Adiantando-se o processo, observa-se que os cromozomios do nucleo exterior, assim como as placas polares se tornam, aos poucos, compactos e não deixam perceber mais a separação nitida dos cromozomios aí existentes. Logo depois se nota que, progressivamente, os cromozomios do nucleo exterior que constituem o cone aos poucos, se vão desprendendo delle e começam a passar para o espaço claro que separa a placa polar da massa de elementos do nucleo exterior, e aí surjem dispostos em fila, formando uma especie de corôa em torno á essa placa. Est. 2, fig. 10.

Nesta ocazião, a zona nuclear se torna muito alongada no que tambem é acompa-

Polplatten verbindenden Fäden erscheinen, zerstreut und dieselben nach und nach fast in ihrer ganzen Ausdehnung bedeckend, die Chromosomen des Aussennucleus, welche vorher ringförmig um die grosse Axe des Kernfeldes gelagert waren. (Tafel 2 Fig. 7).

Dieses Bild ändert sich jedoch bald wieder und während sich die Polplatten weiter entfernen, nimmt die Teilungsfigur eine Cylinder- oder Wurstform an, wobei aber dieselbe Anordnung der Chromosomen des Aussenkerns auf den achromatischen Filamenten weiter besteht.

Diese Periode kann man als die Metaphase des Teilungsprozesses ansprechen; von jetzt ab geht die ganze Tendenz auf die Bildung der Tochterkerne.

Man bemerkt dann als erstes Anzeichen der neuen Richtung, welche der Prozess einschlägt, eine Einschnürung der vorstehenden Figur in der Mitte ihrer Längsrichtung, während die dort befindlichen Chromosomen nach beiden Seiten abrücken, um zwei konische Gruppen zu bilden, deren Spitzen einander zugewendet sind, während die Basen nach den Polplatten gerichtet sind, von denen sie durch eine helle, von achromatischen Fäden durchsetzte Zone getrennt werden. Den Centralfaden, welcher die beiden Centriolen verbindet, sieht man diese schmalen, hellen Zonen von einer Seite zur andern durchsetzen. (Tafel 2 Fig. 9). Bei weiterem Fortschreiten des Prozesses sieht man, wie die Chromosomen des Aussennucleus und die Polplatten sich immer dichter anordnen, so dass die deutliche Trennung der daselbst vorhandenen Chromosomen verwischt wird. Kurz darauf bemerkt man, dass die Chromosomen des Aussennucleus, welche den Konus bilden, sich allmälig fortschreitend von demselben ablösen und dem hellen Raume zurücken, welcher die Polplatten von der Masse der Elemente des Aussenkerns trennt, und sich dort in einer Reihe ordnen, welche eine Art von Kranz um diese Platte bildet. (Tafel 2 Fig. 10). Bei dieser Gelegenheit zieht sich die Kernzone sehr in die Länge und wird darin vom Protoplasma der Amoebe begleitet, welche sich im sel-

nhada pelo protoplasma da ameba que, então se tem alongado no mesmo sentido e, não raro já se começa a observar os primeiros sinais de divizão do protoplasma que se faz diretamente, pelo estreitamento progressivo delle, na parte media.

Coincide com os primeiros indicios da divizão do protoplasma o rompimento, na parte media, do filamento de união dos centriolos, que ainda ligava os produtos da divizão nuclear, izolando-se, então, de cada lado da ameba os elementos dos futuros nucleos.

A's vezes a segmentação do protoplasma é tão rapida que as amebas já se acham izoladas, achando-se ainda o nucleo em faze bastante atrazada de reconstituição nuclear, Est. 2, fig. 11.

A' medida que os cromozomios do nucleo exterior vão passando para a zona intermediaria acima mencionada, o cone primitivo de cromozomios vai aos poucos diminuindo de tamanho.

Por sua vez a placa polar aumenta de volume e vai se arredondando e tomando a forma do futuro cariozoma que della se rejenerará. O contorno da zona nuclear começa a se arredondar, vae se tornando mais nitido, e nelle não tarda a se esboçar uma membrana, cujos extremos tocam os restos do cone do nucleo exterior. Os cromozomios do nucleo exterior que, até ha pouco, formavam corôa em torno da placa polar, começam a cercar o futuro cariozoma, já então ligado á membrana por delicados filamentos acromaticos. Est. 2, fig. 12.

Daqui em diante, a reconstituição nuclear se processa rapidamente e em breve o cariozoma aprezenta sua forma esferica normal, ocupa o centro do nucleo, emquanto os cromozomios do nucleo exterior tomam a sua dispozição tipica junto á membrana nuclear.

Termina aqui o processo de divizão vejetativa da ameba. Durante as fazes delle se observa que o rizopode, á medida que progride o fenomeno aprezenta cada vez maior diminuição da motilidade, até se completar a divizão celular e a rejeneração do nu-

ben Sinne streckt; nicht selten beginnen dann bereits die ersten wahrnehmbaren Erscheinungen der Protoplasmateilung, welche direkt durch Einschnürung im mittelsten Teile erfolgt. Mit den ersten Anzeichen derselben koinzidiert die in der Mitte erfolgende Durchschnürung des Verbindungsfadens der Centriolen, welcher die Produkte der Kernteilung noch zusammen hielt, worauf sich auf beiden Seiten der Amoebe die Elemente der zukünftigen Kerne isolieren.

Manchmal ist die Teilung des Protoplasmas eine so rasche, dass man die Amoeben schon getrennt findet, während ihre Kerne sich noch in einer wenig vorgeschrittenen Phase der Rekonstitution befinden. (Tafel 2 Fig. 11).

In dem Maasse, wie die Chromosomen des Aussennucleus nach der oben erwähnten intermediären Zone rücken, nimmt der ursprüngliche Konus der Chromosomen nach und nach an Grösse ab. Dagegen nimmt die Polplatte an Volum zu, rundet sich ab und nimmt die Form des zukünftigen Caryosoms an. Der Umriss der Kernzone beginnt sich abzurunden und immer deutlicher zu werden und bald zeichnet sich eine Membran, deren Enden die Reste des Aussennuclearkonus äuziehen. Die Thromosomen des Aussennucleus, welche bis vor Kurzem einen Kranz um die Polplatten bildeten, beginnen das zukünftige Caryosom zu umgeben, welches noch durch zarte achromatische Fäden mit der Membran verbunden ist. (Tafel 2 Fig. 12).

Von nun an geht die Rekonstitution des Nucleus rasch vor sich und bald zeigt das Caryosom seine normale sphärische Form, wobei es das Zentrum des Nucleus einnimmt, während die Cromosomen des Aussennucleus ihre typische Lage an der Kernmembran eingenommen haben.

Hier endet der vegetative Teilungsprozess der Amoebe. In seinen verschiedenen Phasen beobachtet man, dass dieselbe, in dem Maasse, wie der Prozess fortschreitet, eine zunehmende Verminderung der Beweglichkeit zeigt, bis die Zellteilung und Regeneration des Kernes eingetreten ist, worauf die Amoebe ihre ursprünglichen Bewegungen wieder aufnimmt.

cleo; depois do que, recupera seus movimentos, como primitivamente.

Alem do processo de divizão vejetativa da ameba, pelo processo de dupla mitoze que acabamos de descrever e que é muito semelhante ao por nós observado na *Polytomella agilis* aprezenta a *Amœba diplomitotica* um segundo aspeto de divizão mais simplificada que a anterior, ao que já nos referimos precedentemente e do qual, agora, passamos a mencionar as principais fazes.

O inicio da divizão, neste cazo, assinala-se pelo alongamento do cariozoma e pelo agrupamento em torno do maior eixo delle, na parte mediana dos elementos do nucleo exterior. Est. 2, fig. 13. Em seguida se observa que, a medida que se alonga o cariozoma, começa a se estreitar na parte media, ao mesmo tempo que nesse ponto aparecem numerozos filamentos acromaticos em torno dos quais se dispoem os cromozomios do nucleo exterior sob a forma de placa equatorial muito nitida. Est. 2, fig. 14.

A seguir, observa-se que, cada vez mais, se estreita o cariozoma na parte central, ao passo que as duas massas que se vão formando nas extremidades da figura, se afastam um pouco uma da outra e afinal apenas ficam ligadas pelo filamento intermediario dos centriolos e pelo filamentos acromaticos cujo numero aos poucos foi aumentando. A placa de cromozomios do nucleo exterior não aprezenta até aqui modificação notavel. Nenhum vestijio resta na zona nuclear da membrana primitiva. Est. 2, fig. 15, 16, 17.

Quando a divizão dos cariozomas já tem atinjido o limite maximo e que elles se acham transformados em duas massas apenas ligadas pelo filamento intermediario dos centriolos, dá-se então o desdobramento da placa primitiva de cromozomios do nucleo exterior, em duas placas filhas, cujos elementos muito regularmente se enfileiram sobre os filamentos acromaticos. Est. 2, fig. 18.

Cada uma dessas placas filhas não tarda a se dirijir para um dos cariozomas secundarios, já então izolados e completamente redondos, e em torno delles se vão agrupando

Ausser dem Prozesse der vegetativen Teilung durch doppelte Mitose, den wir soeben beschrieben haben und welcher dem von uns bei *Polytomella agilis* beobachteten sehr ähnlich ist, zeigt die *Amoeba diplomitotica* noch eine zweite Teilungsweise, welche einfacher als die vorige ist; wir haben dieselbe bereits erwähnt und wollen jetzt die wichtigsten Phasen derselben kurz beschreiben.

In diesem Falle kennzeichnet sich der Beginn des Prozesses dadurch, dass das Caryosoma sich verlängert und die Elemente des Aussennucleus sich um die Mitte seiner längsten Axe gruppiren (Tafel 2, Fig. 13). Hierauf bemerkt man, dass das Caryosom, in dem Maasse wie es sich streckt, sich auch in der Mitte einzuschnüren beginnt, während an dieser Stelle zahlreiche achromatische Fäden auftreten, um welche sich die Chromosomen des Aussennucleus unter der Form einer sehr deutlichen Aequatorialplatte anordnen (Tafel 2, Fig. 14). Hierauf sieht man, wie das Caryosom in seinem mittleren Teile sich immer mehr einschnürt, während die beiden Massen, die sich an den Enden der Figur bilden, sich etwas von einander entfernen, bis sie schliesslich nur durch die Verbindungsfäden der Centriolen und, die allmälig an Zahl zunehmenden, achromatischen Fäden verbunden sind. Die Chromosomenplatte des Aussennucleus zeigt bis dahin keine bemerkenswerte Veränderung. In der Kernzone bleibt keine Spur der ursprünglichen Membran erhalten. (Tafel 2, Fig. 15, 16 u. 17). Wenn die Teilung der Caryosome bereits ihre äusserste Grenze erreicht hat und dieselben sich in zwei Massen verwandelt haben, welche nur durch die Verbindungsfäden der Centriolen zusammenhängen, dann erfolgt die Teilung der ursprünglichen aussennucleären Chromosomenplatte in zwei Tochterplatten, deren Elemente sich sehr regelmässig auf den achromatischen Fäden aufreihen. (Tafel 2, Fig. 18). Jede dieser Tochterplatten beginnt sofort, sich nach einem der sekundären Caryosome zu begeben (welche dann schon vollständig isoliert und abgerundet sind), worauf sie sich um dasselbe lagert und es zu umfassen sucht. An den Grenzen der Kernzone, deren Länge dann das Doppelte

e procurando cercal-os. Est. 2, fig. 19. Nos limites da zona nuclear, cujo comprimento não excede então o dobro da largura, começa se a notar a reconstituição da membrana, assim como os primeiros indicios da separação dos futuros nucleos. Como concluzão do processo obtem-se no interior da ameba, dous nucleos completamente constituidos, collocados um ao lado do outro. Est. 2, fig. 20.

O processo de divizão nuclear da ameba, mais simplificado neste cazo, nem sempre se faz com a regularidade e egualdade acima descritas; não muito raro é observar-se a divizão muito desegual dos cariozomas donde o constituir-se no interior da ameba dous nucleos de tamanho diverso. Est. 2, fig. 21, 22.

O processo de divizão nuclear acima descrito não se acompanha obrigatoriamente da divizão do protoplasma da ameba, muitas vezes até ha tempo della se processar 2 vezes, sem que o protoplasma se segmente, donde o aparecimento de amebas com 4 nucleos formados pelo processo acima.

A regra porém é que uma vez formados os dous nucleos, o protoplasma da ameba se segmente, ficando cada porção delle com um dos nucleos. Não se nota alteração na mobilidade da ameba, no decorrer das fazes de divizão.

Os dous processos de divizão da *Amœba diplomitotica* que acabamos de descrever parecem bem diversos um do outro e, tanto quanto podemos assegurar, destinados cada um delles a um processo de multiplicação do rizopode.

O processo de divizão por dupla mitoze, corresponde á divizão vejetativa da ameba; é o que assegura a regular e egual distribuição dos cromozomios do nucleo exterior e do cariozoma dos nucleos secundarios. Por ser processo de divizão mais complexo é, por isso mesmo, mais lento.

O segundo modo da divizão da ameba, ao contrario, se carateriza pela menor regularidade na distribuição dos cromozomios pelos nucleos secundarios; é, tambem, por ser menos complexo, mais rapido e o mais apro-

der Breite nicht überschreitet, fängt man an, die Rekonstitution der Membran und die ersten Anzeichen der Trennung der zukünftigen Kerne zu erkennen. Als Schluss des Prozesses erhält man im Innern der Amoebe zwei vollständig ausgebildete Kerne, welche neben einander gelagert sind (Tafel 2, Fig. 20). Der in diesem Falle vereinfachte Kernteilungsprozess der Amoebe vollzieht sich nicht immer mit der angegebenen Schnelligkeit und Gleichmässigkeit; nicht selten beobachtet man eine sehr ungleichmässige Teilung, so dass sich im Innern der Amoebe zwei Kerne von ungleicher Grösse bilden. (Tafel 2, Fig. 21, 22).

Der oben beschriebene Kernteilungsprozess wird nicht notwendig von der Teilung des Protoplasmas der Amoebe begleitet, ja derselbe findet oft Zeit, sich zu wiederholen, ohne dass das Protoplasma sich teilt, was zu dem Vorkommen von Amoeben mit vier auf obige Weise entstandenen Kernen führt. Die Regel ist jedoch, dass nach Bildung der beiden Kerne das Protoplasma der Amoebe sich teilt und jeder Teil desselben einen Kern behält. Man bemerkt dabei keine Veränderung der Beweglichkeit der Amoebe im Verlauf der Teilungsphasen.

Die beiden Teilungsprozesse der *Amoeba diplomitotica,* welche wir soeben beschrieben haben, verlaufen sehr verschieden von einander, obwohl sie, soviel wir versichern können, beide dem Zwecke der Vermehrung des Rhizopoden dienen.

Der Prozess der Teilung durch doppelte Mitose entspricht der vegetativen Teilung der Amoebe und garantiert die regelmässige und gleichmässige Verteilung der Chromosomen des Aussennucleus und des Caryosoms auf die sekundären Kerne. Als komplizierterer Teilungsprozess ist er auch eben deswegen ein langsamerer.

Im Gegensatz hierzu kennzeichnet sich die zweite Teilungsweise der Amoebe durch die geringere Regelmässigkeit der Verteilung der Chromosomen auf die sekundären Kerne; als weniger kompliziert, auch ist sie rascher und mehr geeignet, eine schnelle Vermehrung der Amoebe zu garantiren; die Teilung oder richtiger die Fragmentierung des Protoplasmas

priado a assegurar a rapida multiplicação da ameba; a segmentação do protoplasma, ou melhor, a fragmentação delle indica o seu relacionamento com o processo de divizão chizogonica da ameba.

Os dous aspetos diversos da divizão nuclear da *Amœba diplomitotica* foram os que observámos no decurso de nossas pesquizas e aos quais demos a interpretação que, de acordo com os fatos, nos pareceu mais lojica. Existe certa semelhança entre o processo de divizão da ameba que estudamos e a da *Amœba limax* pesquizada por Wahlkampf; é evidente, porem, que no nosso cazo a complexidade do fenomeno é bem maior.

E' bastante interessante sob o ponto de vista filojenetico assinalar a semelhança entre os processos de divizão da *Amœba diplomitotica* e da *Polytomella agilis,* ambos protozoarios tipicos de grupos diversos, embora relacionados, como as amebas e os flajelados.

A parte mais interessante da biolojia da *Amœba diplomitotica,* é incontestavelmente a divizão della.

O enquistamento nada tem de notavel; processa se como nas amebas do typo *limax.*

Os quistos, quando formados são circulares, e medem 7,5 μ. de diametro, são quazi eguais uns aos outros. Têm a côr amarelada e são limitados por duplo envoltorio constituido internamente por uma membrana de duplo contorno nitido e, externamente, por membrana de contorno externo um pouco irregular. Em cada quisto apenas se vê um nucleo; não conseguimos nelles observar qualquer indicio de multiplicação nuclear ou de autogamia. Egualmente nunca nos foi possivel encontrar, em qualquer periodo da evolução da ameba, fazes de copulação, como recentemente assinalaram na *Amœba diploidea* Hartmann e Nœgler.

deutet seine Verwandtschaft mit dem schizogonischen Teilungsprozess der Amoeben an.

Diese beiden verschiedenen Bilder der Kernteilung der *Amoeba diplomitotica* sind es, die wir im Laufe unserer Untersuchungen beobachteten und die wir so deuteten, wie es uns in Uebereinstimmung mit den Tatsachen, am logischsten erschien. Es besteht eine gewisse Aehnlichkeit zwischen dem Teilungsprozesse der Amoebe, welche wir studierten und demjenigen der *Amoeba limax*, welcher von VAHLKAMPF untersucht worden ist; jedoch ist es klar, dass in unserem Falle die Erscheinung eine weit kompliziertere ist. Vom phylogenetischen Gesichtspunkte aus ist es nicht uninteressant, die Aehnlichkeit zwischen den Teilungsprozessen der *Amoeba diplomitotica* und der *Polytomella agilis* hervorzuheben, zweier Protozoen, welche für zwei verschiedene, wiewohl verwandte Gruppen, wie die Amoeben und Flagellaten, typisch sind.

Der interessanteste Teil der Biologie der *Amoeba diplomiiotica* ist unzweifelhaft ihre Teilung.

Die Incystirung bietet nichts bemerkenswertes und vollzieht sich wie bei den Amoeben vom *Limax*-typus. Die vollendeten Cysten sind rund und messen 7,5 Mikra im Durchmesser; sie sind einander fast gleich, von gelblicher Farbe und von einer doppelten Hülle umgeben, inwendig von einer Membran mit deutlich doppeltem Umrisse und auswendig von einer solchen mit etwas unregelmässiger äusseren Kontur. In jeder Cyste sieht man nur einen Kern; niemals haben wir in denselben irgend ein Anzeichen einer Kernvermehrung oder Autogamie bemerken können. Ebenso war es uns niemals möglich, in irgend einer Entwicklungsperiode unserer Amoebe Copulationsphasen anzutreffen, wie sie HARTMANN und NAEGLER bei der *Amoeba diploidea* neuerdings angegeben haben.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

LITERATURA

1) Schaudinn, F. — Ueber die Theilung von Amoeba binucleata. Sitzungs-Bericht der Gesellschaft N.-Freunde. Berlin, 1895.
2) Awerinzew. — Ueber die Theilung bei Amoeba proteus. Zool. Anz., 1904.
3) Vahlkampf, E. — Beiträge zur Behandlung und Entwicklungsgeschichte von Amoeba limax. Archiv für Protistenkunde, 1905. Vol. 5.
4) Prowazek. — Entamoeba buccalis n. sp. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. Vol. 21.
5) Leyden-Löwenthal. — Entamoeba buccalis (Prowazek) bei einem Fall von Mund-boden-Carcinom. — Charité Annalen, XXIX. Jahrgang.
6) Wenyon. — Protozoa of the intestine of Mice. Archiv f. Protistenkunde. Supplement I, 1907.
7) Doflein. — Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. Archiv f. Protistenkunde. Supplement I, 1907.

Contribuição para o estudo dos parazitas intraglobulares dos lacértidas

Plasmodium diploglossi n. sp. Plasmodium tropiduri n. sp.

pelos Drs.

H. de Beaurepaire Aragão e **Arthur Neiva**

Assistentes do Instituto.

(Estampa 3)

A contribution to the study of the intraglobular parasites of the lizards.

Two new species of **Plasmodium, Pl. diploglossi** n. sp. and **Pl. tropiduri** n. sp.

by Drs.

H. de Beaurepaire Aragão e **Arthur Neiva**

Assistents.

(Plate 3)

Até 1901 não se conhecia, nos animais de sangue frio, outros parazitas dos globulos vermelhos além das hemogregarinias. Nessa época, Simond descreveu um hematozoario pigmentado no sangue de uma tartaruga *(Trionyx indicus,* Gray) o qual elle denominou de *Hemamœba metchnikovi.* Mais tarde, em 1904, Castellani viu outro parazita da mesma natureza, no sangue do *Hemidactylus leschenaulti,* Gray e aproveitou a ocazião para crear com este hematozoario e o descrito por Simond, novo genero, *Hemocystidium,* a que elle dá carater provizorio, ao mesmo tempo que assinalava a grande semelhança entre esses parazitas e os hemoproteos das aves. A nós parece que os hematozoarios de Simond e Castellani deveriam ser incluidos entre os hemoproteos, até que o conhecimento mais completo do ciclo delles viesse justificar sua colocação em outro genero.

Estas considerações vêm a propozito de dous novos parazitas intraglobulares dos lacértidas, bem diferentes dos precedentes que tivemos, ha algum tempo, ocazião de observar e que, morfolojicamente, têm os caracteres dos plasmodios do tipo proteozoma das aves.

Up to 1901 the only intraglobular parasites known from cold blooded animals belonged to the haemogregarinae. At that date Simond described a pigmented haematozoon from the blood of a turtle (*Trionyx indicus* Gray) and gave it the name: *Haemamoeba metchnikoffi.* Later, in 1904, Castellani, having observed another parasite of the same kind in the blood of the *Hemidactylus leschenaulti,* Gray, established for this and the one observed by Simond a new genus: *Haemocystidium* which he considers as only provisory, noticing at the same time the great ressemblance between these forms and the haemoproteus of the birds. It seems to us that both haematozoa ought to be included in the genus *haemoproteus,* at least until a more perfect knowledge of their evolution might justify the establishment of a new genus.

These reflexions were made while we had the chance of observing two other blood-parasites of lizards which morphologically fol-

Um desses parazitas foi encontrado no sangue de *Diploglossus fasciatus* D. B. obtidos no Xerém, Estado do Rio, por um de nós (Neiva), o outro observámos em preparados de sangue de *Tropidurus torquatus,* Wied., que nos foram trazidos de Bicudos, Estado de Minas, pelo Dr. Carlos Chagas.

Atenta a semelhança morfolojica desses hematozoarios com os plasmodios, rezolvemos colocal-os nesse genero, dezignando-os respetivamente, *Plasmodium diploglossi* e *Plasmodium tropiduri,* até que o conhecimento mais completo venha mostrar a necessidade da incluzão delles em outro genero.

Plasmodium diploglossi

Este parazita é encontrado no sangue do *Diploglossus fasciatus,* vulgarmente conhecido por lagarto cobra, lacértida bastante raro e do qual, até agora, só tivemos ocazião de observar quatro exemplares, dous do Xerém, infetados, e os outros de Ouro-Fino, Estado de Minas, não parazitados.

Aqui no Instituto, tivemos vivo durante alguns dias, um dos exemplares de *Diploglossus* com grande infeção e foi com elle que conseguimos fazer as experiencias abaixo mencionadas.

Em primeiro logar tentámos infetar outros lacértidas *(Tropidurus torquatus, Ameiva surinamensis, Mabuia agilis,* D. B., *Hemidactylos mabuia)* inoculando-lhes por via intra-muscular, sangue retirado do animal infetado. Não foi possivel obter a infeção em numerozos animais inoculados.

Procurámos tambem fazer com que mosquitos diversos, *Culex confirmatus,* An., *Culex teniorhynchus,* Wied., muito comuns nos logares em que o lacértida é encontrado, o picassem; elles, porém, sempre se recuzaram a isso.

Tendo morrido, inesperadamente, o animal infetado que possuiamos não nos foi posivel experimentar com outros mosquitos e demais insetos sugadores de sangue e ixódidas. Nenhum ecto-parazita foi encontrado sobre os animais infetados ou não.

O estudo do parazita foi feito em preparações a fresco, entre lamina e laminula ou

low the type of the proteosoma of the birds. One of them was found in the blood of a *Diploglossus fasciatus,* D. B. caught by one of us (Neiva) in Xérem (State of Rio de Janeiro), the other was discovered in bloodsmears of a *Tropidurus torquatus,* Wied., brought by Dr. Carlos Chagas from Bicudos in the State of Minas. Considering the morphological ressemblance of these cytozoa with the plasmodia we shall include them in this genus as *Plasmodium diploglossi* and *tropiduri,* while waiting for a more complete knowledge which might oblige us to place them in another genus.

Plasmodium diploglossi n. sp.

This organism was found in the blood of the *Diploglossus fasciatus,* commonly known as *snakelizard,* a rather rare kind of which up to date we have only observed four specimens, two of which were infected, while the two others (from Ouro Fino in the State of Minas) where free from blood parasites.

One of them could be kept alive during some days; it showed a very strong infection and gave us the chance to perform some experiments. In first instance we tried to infect some other lizards *(Tropidurus torquatus, Hemidactylus mabuia, Ameiva surinamensis* and *Mabuia agilis* D. B.), by inoculating them in the muscles with blood obtained from the infected animal, but in all the numerous experiments we failed to reproduce the infection.

After that we tried to have the animal bitten by two kinds of mosquitos commonly found in the same places as the lizards *(Culex confirmatus* and *C. taeniorhynchus),* but both refused to bite.

The unexpected death of the infected animal prevented us from experimenting with more mosquitos and bloodsucking insects or

em gota pendente e em preparações fixadas pelo alcool metilico e córados pelo Giemsa.

O parazita é essencialmente intraglobular; nas preparações a fresco, quando ainda muito joven, aparece sob a fórma de pequena massa arredondada que não excede a 2 μ, colocada no protoplasma do globulo, junto a uma das extremidades. Aprezenta-se, então, constituido por pequena massa de protoplasma de estrutura finamente alveolar, de colorido amarelo palido, no interior está o nucleo que aí aparece sob a fórma de pequeno corpusculo arredondado. Córadas pelo Giemsa, estas fórmas se aprezentam com o aspeto de pequeno anel ou de pequena massa poligonal e são constituidas por porção de protoplasma córado em azul claro; no centro ou em uma das bordas existe pequena massa de cromatina intensamente corada em vermelho rubi e ás vezes ainda, pequeno vacuolo nutritivo. Est. 3, figs. 1, 2, 11 a, b, 12 e 13.

Em periodo mais adiantado do dezenvolvimento, o parazita começa a tomar a forma alongada e não tarda a se curvar sobre a extremidade do nucleo do eritrócito, começando a envolvel-o. Desde que o parazita tenha atingido certo dezenvolvimento, começa-se a observar nas fórmas pertencentes ao ciclo esquizogonico, a divizão nuclear e o aparecimento de granulos de pigmento castanho-escuro. Est. 3, figs. 3, 4, 5 e 12 b.

A influencia do parazitismo não tarda a se fazer sentir sobre os globulos; o colorido torna-se um pouco menos intenso, o nucleo se deforma, a celula aumenta de dimensões e aprezenta o contorno menos regular que normalmente; pode atinjir, então, 19 μ de comprimento, por 11 μ de largura, quando, normalmente, estas dimensões não excedem a 15×9 μ.

Continuando o parazita a se dezenvolver, cerca francamente o nucleo que se torna arredondado e, ás vezes, fundindo-se as extremidades, forma anel completo em torno delle, emquanto o globulo se aprezenta cada vez mais hipertrofiado.

Já se póde, então, observar no protoplasma do parazita, tanto a fresco, como nas preparaixodidae. We also failed to find ectoparasites on any of the four specimens.

The parasite was studied in fresh preparations, under coverslip and in hanging drops, as well, as in dry bloodsmears fixed in methylated alcohol and stained by Giemsa's fluid. It is essentially endoglobular being observed in fresh preparations, when still young, in the shape of small rounded bodies, not more than two mikra in diameter, inside and near to one end of the red bloodcells. They consist of a finely alveolar protoplasm of pale yellow colour enclosing a small rounded nucleus. In Giemsa's preparations they appear as small ringshaped or polygonal masses, stained pale blue, with rubycoloured particles of chromatin lying in the centre or more peripherically; sometimes a small vacuole is also found. (Plate 3, Fig. 1, 2, 11 a, b, 12, 13).

While the evolution is progressing the parasite takes a more elongated shape curling around the nucleus; at an early periode one detects in the forms belonging to the schizogonic cycle the division of the nucleus and the apparition of granules of dark brown pigment. (Plate 3, Fig. 4, 5, 12 b, c).

The influence of the parasite on the red bloodcells appears soon: the colour becomes paler, the nucleus is deformed, the cell increases and its outlines become less regular. It may attain 19:11 mikra while the normal dimensions never exceed 15:9 mikra. While continuing its growth the parasite includes completely the nucleus which becomes rounded; the ends of the parasite may unite so as to form a perfect ring.

In later stages the protoplasm of the parasite shows — in fresh, as well as in dry and stained preparations — a varying number of chromatin corpuscles and granules of pigment corresponding in number to the deve-

ções córadas, numero variavel de massas de cromatina e granulos de pigmento, em proporção com o dezenvolvimento delle, acumulados quazi todos em um ponto do protoplasma. Est. 3, figs. 12 e, f e 13 b.

Os esquizóntes, em faze mais adiantada de dezenvolvimento se aprezentam sob a fórma de massa de protoplasma cheia de fragmentos de cromatina e com mais pigmentos que nas fazes anteriores e ocupam todo ou quazi todo o protoplasma do eritrócito. Est. 3, figs. 7, 8, 9, 11 d e 13 c.

O numero de massas de cromatina nessas fórmas, não raro excedem a 40. Cada uma corresponde a um futuro merozoito, na ocazião da completa divizão do parazita. Est. 3, fig. 11 d. Os merozoitos, uma vez formados, se separam e vão parazitar novos eritrócitos. Em um campo de um de nossos preparados elles se encontravam livres entre os globulos. Est. 3, fig. 11 c. Nas preparações a fresco, porém, nunca lográmos observar a passajem dos merozoitos para o plasma ou para os globulos.

Os merozoitos, no interior dos globulos ou livres aparecem nas preparações fixadas e córadas com fórma quazi triangular; a fresco, porém, são arredondados e têm a cromatina excentricamente colocada.

Não conseguimos determinar o prazo da evolução esquizogonica, por aprezentar sempre o animal as mais variadas fórmas no sangue.

Os gametos do *Plasmodium diplogossi* se distinguem facilmente em machos e femeos.

Sua evolução no interior do globulo não é muito diversa da de uma forma esquizogonica. Elles, aos poucos, se expandem pelo protoplasma do globulo, cercam, deformando o nucleo, assim como hipertrofiam a celula. Est. 3, figs. 5, 10, 12 f e 13 d.

Os gametos femeos aprezentam um protoplasma denso em que se vêm disseminados numerozos pequenos granulos de pigmento, um pouco dezeguais, além de um ou outro vacuolo; o nucleo é reprezentado por massa de cromatina, maior, cercada, geralmente, de numerozos granulos menores. Não raro se vêm ainda, dispersos no protoplasma do gameto 2 ou 3 pequenas massas

lopment and forming a group in one point of the protoplasm. (Plate Fig. 12 c, e, f and 3 b.

The schizontes in a more advenced stage of development appear in the form of a mass of protoplasm full of chromatinfragments and with more pigment than in the former stages occupying all or nearly all the protoplasm of the red bloodcell. (Plate 3, fig. 7, 8, 9, 11 d, and 13 c).

The number of the chromatin granules in the stages figured there may exceed forty and each one corresponds to a future merozoite. (Fig. 11 d) After the dissolution of the schizont these infect new globules. In one of our dry slides. (Plate 3, Fig. 11 c) they were found free between the bloodcells, but in fresh preparations we could never observe the passage of the merozoites in the plasma or in other globules.

The endoglobular or free merozoites appear in fixed and stained preparations in nearly triangular shape but in fresh preparations they are rounded, with the chromatine excentrically located.

We could not determine the time employed in the schizogonic evolution because the different stages were all found at the same time.

The gametocytes and macrogametes of the *Plasmodium diploglossi* are easily distinguished. Their evolution inside of the globules is not very different from that of the schizogonic form. They expand gradually in the protoplasm of the bloodcells, enclose and deform the nucleus and produce the hypertrophy of the cell itself. (Plate 3, Fig. 5, 10, 12 f. 13 d).

The female gametes show a dense protoplasm containing numerous small and somewhat unequal pigmentgranules and also some vacuoles. The nucleus is represented by a

de cromatina, muito provavelmente produtos emanados do nucleo.

Os gametos femeos se distinguem dos machos pelo tamanho, que é menos avantajado, pelo protoplasma pouco denso e muito menos intensamente córavel, pela fina e abundante pigmentação e pelo nucleo, que é reprezentado por pequena massa arredondada, que constitue o centro, a partir do qual se irradiam, disseminando pelo protoplasma, pequeninas massas de cromatina que formam, em torno delle trama muito delicado.

No sangue examinado entre lamina e laminula ou em gota pendente, observa-se que, ao cabo de algum tempo os gametos tomam a forma esferica e que o pigmento começa a aprezentar movimentos que chegam a ser muito intensos, durante algum tempo no gameto macho; nunca, porém, observámos a emissão de flagelos, talvez porque as condições do meio não fossem favoraveis ao fenomeno, pois muito rapidamente cessava o movimento do gameto, indicio da diminuição de vitalidade.

Plasmodium tropiduri n. sp.

Este parazita só foi estudado até agora em preparados de sangue córados pelo Giemsa. Máo grado todos os esforços, não conseguimos, até agora, obter animais vivos, infetados para nelles estudar a evolução do parazita.

A disseminação da infeção nos tropiduros parece não ser muito vasta, pois, até agora, não encontrámos um só animal infetado, entre muitos provenientes do Rio, do Xérem, de Juiz de Fóra e S. Paulo, ao passo que em Bicudos, segundo nos afirmou o dr. Chagas, quazi todos os tropiduros estão infetados.

O *Plasmodium tropiduri* é parazita bem menor que o precedentemente descrito e, ao contrario delle aprèzenta a maior semelhança morfolojica com os plasmodios do tipo proteozoma do sangue das aves.

Nos globulos infetados, os parazitas são quazi excluzivamente encontrados nas extremidades da celula e nesse ponto se processa toda evolução. Não raro, nos eritrócitos em que existem dous parazitas, cada um ocupa uma das extremidades.

larger mass of chromatin surrounded generally by other smaller ones. It is not very rare to observe two or three smaller chromatinmasses distributed in the cellplasm which are probably derived from the nucleus.

These microgametocytes are distinguished from the macrogametes by their smaller size, the less dense and paler protoplasm, the larger and less abundant pigmentgranules and by the conditions of the nucleus. It consists in a small rounded chromatinmass, forming the centre from which small chromatin particles radiate into the protoplasm in the shape of a delicate network.

In fresh preparations the gametocytes and macrogametes after some time take a spherical shape and shortly afterwards the pigment begins to show movements which in the former may become very intense. We could never observe the emission of flagella, perhaps because the conditions of the medium were not favourable, as the speedy diminution of the motility seemed to indicate.

Plasmodium tropiduri n. sp.

The *Plasmodium tropiduri* has been studied only in bloodsmears stained with Giemsa's fluid, as all our efforts to obtain living infected specimens of the host remained unsuccessfull.

The parasite does not seem to be very wide spread, as we could not find an infected individual amongst a great number of specimens from Rio de Janeiro, Xerem, Juiz de Fóra and São Paulo, while in Bicudos (State of Minas) Dr. Chagas found almost every individual infected.

This plasmodium is much smaller as the one previously described and, in contrast with it, shows the greatest ressemblance with the

Os globulos parazitados pelas formas mais dezenvolvidas do hematozoario aprezentam-se, geralmente, um pouco aumentados de volume e deformados, principalmente na extremidade em que se assesta o parazita. Tambem o nucleo não escapa á influencia do parazitismo e aprezenta-se, ás vezes, lijeiramente deformado.

As formas mais jovens deste plasmodio não se diferenciam muito das do anteriormente descrito; são reprezentadas por pequenos corpusculos arredondados ou em forma de anel, constituidos por diminuta porção de protoplasma córado em azul claro pelo Giemsa, tendo, ás vezes, vacuolo nutritivo e massa de cromatina excentricamente colocada. Est. 3, fig. 14.

Caracterizam faze mais adiantada na evolução do parazita, as fórmas um pouco maiores que as precedentes alongadas ou, então, quazi regularmente redondas e ainda sem indicios de segmentação nuclear. Est. 3, fig. 15.

As formas pertencentes ao ciclo esquizogonico, desde que um pouco mais dezenvolvidas começam a aprezentar o nucleo fragmentado, observando-se nellas pequenos granulos de pigmento.

Nenhum indicio de divizão mitozica se observa nos esquizóntes, nos quais o maximo de merozoitos pode atinjir a 12. São mais ou menos regularmente arredondados, e aprezentam-se constituidos por massa de protoplasma de contornos irregulares, tendo no interior pequenas massas de cromatina, em numero variavel, proporcional ao seu dezenvolvimento, até o maximo acima assinalado; o pigmento aparece nelles aglomerado em um ponto. O diametro das maiores formas mais dezenvolvidas não excede a 7 a 8 μ. Est. 3, figs. 16, 17, 18 e 19.

Quando o numero de merozoitos atinje ao maximo, acima citado, começa a segmentação do protoplasma, em torno de cada um e assim, constituem-se os merozitos destinados a infeção de novos globulos.

Os gametos do *Plasmodium tropiduri* se distinguem perfeitamente, nos preparados córados, pelos seus caracteres proprios em masculinos e femininos. Tanto uns, como outros

proteosoma of birds. In the infected globules the parasites are almost invariably found at the end of the bloodcells where the whole evolution is performed. It is not rare to find in the same globule two parasites, each of which occupies the opposite end of it.

The erythrocytes containing the larger forms are generally swollen and deformed, principially at the end where the parasite is located. The nucleus also sometimes shows the influence of the parasite by a slight deformation.

The younger stages of the plasmodium do not differ much from the forms described before, being small rounded or ringshaped bodies of protoplasm staining pale blue by Giemsa's method and showing sometimes a nutritive vacuole and an excentrically located chromatine mass. (Plate 3, Fig. 14).

A more advanced stage of the parasite is known by somewhat larger forms, either allongated or almost regularly rounded but not showing yet any indication of segmentation of the nucleus. (Plate 3, Fig. Fig. 15). Still later forms show fragmentation of the nucleus and small granules of pigment. There is no indication of mitosis in the schizogonic forms in which the maximum of merozoites may attain 12. They are more or less regularly rounded and constituted by a mass of protoplasm, including small masses of chromatin in varying number up to the maximum of twelve; the pigment is collected in one place anf their diameter does not exceed 7 to 8 mikra. (Plate 3, Fig. 17, 18, 19).

When the division of the chromatin is completed the segmentation of the protoplasm takes place forming the merozoites.

The microgametocytes and female gameses are easily distinguished by their aspect. The macrogametes show a very regular outline and measure 6-8 *mikra,* the protoplasma

são sempre encontrados nas extremidades das celulas, aplicados de encontro ao nucleo.

Os gametos femeos adultos têm a forma esferica muito regular, medem 7 a 8 μ de diametro; o protoplasma é denso, bastante homojeneo e córa-se em azul intenso pelo Giemsa. Em um ponto qualquer delle, geralmente na periferia se encontra o nucleo, reprezentado por diversas placas de cromatina reunidas umas ás outras, formando uma massa unica.

O pigmento se acha irregularmente distribuido por todo o parazita, sob fórma de pequenas massas arredondadas, de colorido pardo escuro. Est. 3, fig. 20.

Os gametos masculinos são, em geral, maiores que os femininos; não raro atinjem 9 μ de diametro, são arredondados como aquelles, porém não tão regularmente. O protoplasma córa-se muito fracamente em azul pelo Giemsa e o nucleo é constituido por delicado trama de bastonetes de cromatina que ocupa grande parte do protoplasma. O pigmento aparece sob fórma de pequenos blocos alongados, pouco numerozos distribuidos no protoplasma. Est. 3, fig. 21.

Os gametos macho e femeo, muito claramente distintos, quando completamente dezenvolvidos, já o são igualmente em periodo menos adiantado de evolução, se bem que menos nitidamente. Não têm então a forma arredondada e se parecem muito com as fórmas esquizogonicas; distinguem-se dellas, porem, pela prezença de nucleo unico e pela disseminação do pigmento no protoplasma.

As diferenças sexuais, si bem que igualmente menos acentuadas são já bastante patentes nelles.

being dense, homogeneous and intensely blue when stained by Giemsa's method. The nucleus is found in any place, mostly in the periphery, and constituted by several fragments of chromatin agglomerated in a single mass.

The pigment is irregularly distributed in the whole body forming small rounded masses of darkbrown hue. (Plate 3, Fig. 20).

The microgametocytes are generally larger than the female gamete attaining sometimes 9 *mikra*; their shape is less regularly rounded. The protoplasm stains a pale blue and the nucleus is formed by a few allongated chromatin masses, equally distributed in the cell plasm. (Plate 3, Fig. 21).

The two forms may be distinguished already in the less advanced periods though not quite as easily as in the adult stage. The earlier stages are not so regularly rounded and ressemble much the schizogonic forms. They are however recognized by the single nucleus and by the dissemination of the pigment. Both the forms are also found always in the ends of the bloodcells and near to the nucleus.

Literatura

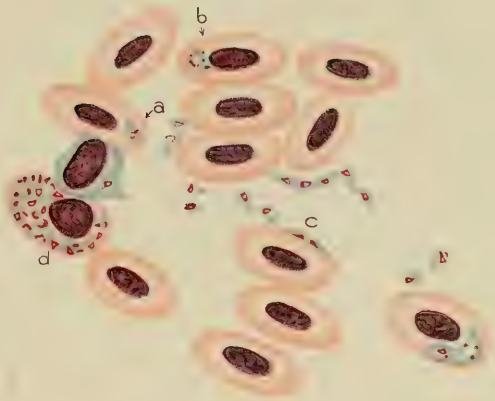
Dr. P. H. Simond, Contribution à l'étude des Hématozoaires endoglobulaires des Reptiles. Ann. Inst. Pasteur T. XV., 1901, p. p. 319, 350.

A. Castellani and A. Willeg, Spolia Zeylanica, Vol. II. Part. VI p. p. 84, 1904. Observations on the Haematozoa of Vertebrates in Ceylon.

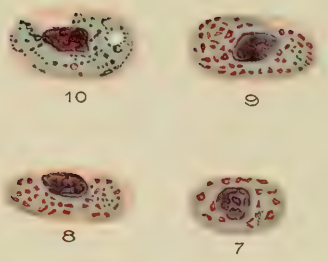
G. Bonet, Comp. Rend. de la Société de Biologie p. 43, 1904. Sur deux hémocytozoaires pigmentés des reptiles.

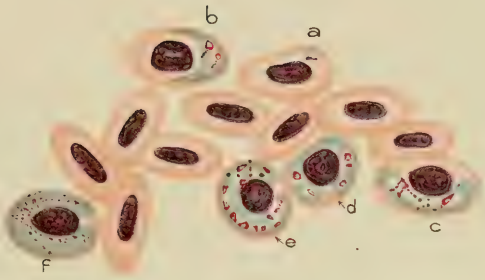
C. M. Wenyon. Report of Travelling Pathologist and Protozoologist. Third. Report of the Wellcome Besearch Laboratories at the Gordon Memorial College Khartoum 1908. Plasmodium mabuiae pag. 146. Pl. XII, fig. 1, 12, 4.

Id. Id. Hemocystidium najae, pag. 150. Pl. XIV, fig. 1, 17, 21. Pl. XV, fig. 4, 5, 6.

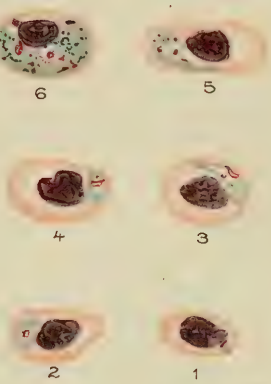


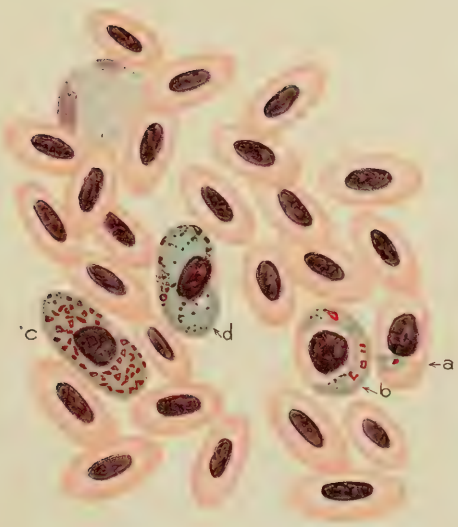
11



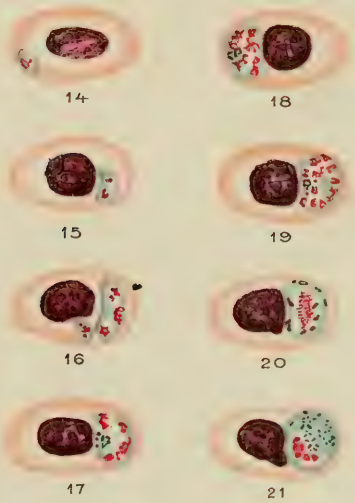


12





13



CASTRO SILVA

Estudos sobre a tuberculoze

pelo

Dr. A. Fontes,

Assistente no Instituto.

Etudes sur la tuberculose

par le

Dr. A. Fontes,

Assistent à l'Institut.

I

Introdução: Considerações gerais e sumarias sobre a terapeutica e imunidade da tuberculoze.

Auzencia de sôros especificos. Razões que a explicam. Toxinoterapia Reabsorção dos germens: por via venoza, por via linfatica (cazo particular da via intestinal). Imunidade natural para a tuberculoze; razões de ordem quimica que a explicam. Orientação seguida. Investigações sobre a natureza das cêras e gorduras extraidas do bacilo. Saponificação pelos alcooles — Fenomeno da acido rezistencia; diagnostico diferencial microscopico entre tuberculozos e pseudo tuberculozos. Estudo das granulações bacilares, sua eletividade para o Gram. Forma granular de Muchs como forma de rezistencia.

Existencia de fermento hidrolizante no ganglio tuberculozo — Extração do fermento — Diminuição do numero de bacilos da tuberculoze *in vitro* em virtude desse fermento — Saponificação da cêra dos bacilos por meio desse fermento.

O capitulo — Tuberculoze — em patolojia tem sido investigado quazi que sob todos os aspetos e, se é verdade que as conquistas da ciencia são nelle numerozas, não é menos real que muito pouco tem sido obtido em relação á terapeutica e á imunização. E' que aí, como geralmente se reconhece, intervem como fator de preponderancia quazi absoluta, o terreno em que evolve a infeção e que pela imperfeição dos metodos atuais de investigação, permanece enigma insoluvel, ocultando reações de ordem quimica que a razão

I

Introduction: Considérations générales et sommaires sur la thérapeutique et l'immunité de la tuberculose.

Manque de sérums spécifiques — Raisons qui l'expliquent. Toxinothérapie — Réabsorption des germes: par voie veineuse, par voie lymphatique (cas particulier de la voie intestinale). Immunité naturelle contre la tuberculose: Raisons d'ordre chimique qui l'expliquent. Orientation suivie. Recherches sur la nature des cires et des graisses extraites du bacille. Saponification par les alcalis — Phénomène de l'acide résistance; diagnostic differenciel microscopique entre les bacilles tuberculeux et les pseudo-tuberculeux. Etude des granulations bacillaires. Son électivité pour le Gram. Forme granulaire de Muchs comme forme de résistance.

Présence d'un ferment hydrolysant dans le ganglion tuberculeux — Extraction du ferment — Diminution du nombre des bacilles de la tuberculose *in vitro* en vertu de ce ferment — Saponification de la cire des bacilles au moyen de ce ferment.

Le chapitre — tuberculose — en pathologie a été considéré sous presque tous ses aspects, et si vraiment les conquêtes de la science sont à cet égard très nombreuses, il n'en est pas moins vrai qu'au point de vue de la thérapeutique et de l'immunisation les résultats obtenus n'ont pas été bien grands.

C'est qu'alors intervient comme facteur prépondérant, presque absolu, le terrain où évolue l'infection et qui, par l'imperfection des méthodes actuelles d'investigation, reste une énigme indéchiffrable, que cache des

prevê que se processam, tornando o meio improprio á vida do bacilo infetante.

De acôrdo com as belas conquistas da soroterapia na generalidade das infeções e por analojia dellas, tudo tem sido feito em relação á tuberculoze e, apoz um curto periodo de esperanças, tudo tem fracassado. Via que foi aberta pelas investigações de Richet e Hericourt, perlustrada mais tarde por Maragliano e Marmoreck, conta no entretanto numerozissimos colaboradores que, por premio só têm obtido a deziluzão lançada pela clinica.

A toxinoterapia, proposta por Koch, empregada hoje em dia com mais criterio, por ser melhor conhecida, daria rezultados absolutamente concludentes, se não existira um *quid* que os experimentadores não têm podido explicar e que consiste na faculdade do organismo tuberculozo reajir *beneficamente* á inoculação da tuberculina, faculdade que em determinados cazos, infelizmente raros, transformam a intervenção do medico em intervenção quazi milagroza. No emtanto o numero de cazos em que o tratamento não aproveita é grande e bastantes vezes são rejistados insucessos. Entra em ação o fator terreno, que quando modificado prepara o sucesso do tratamento especifico (regimen de sanatorios). Falta ás tuberculinas qualquer coiza que facilite seu mister terapeutico; as tuberculinas destróem o tecido tuberculozo; o bacilo, porém, permanece intato quando libertado.

O mesmo insucesso geral permanece no terreno das investigações sobre imunidade na tuberculoze. Desde as inoculações de culturas de bacilos acido-rezistentes banais ás de adenopatias escrofulozas até as injeções de culturas de tuberculoze atenuadas por numerozissimos processos, e entre esses, até aquelle que mais tem prendido a atenção dos especialistas, a bovo-vacina de Behring, quando muito mostram esses metodos a *possibilidade de se obter um aumento de rezistencia do organismo experimentado á inoculação de dóze de bacilos seguramente infetante.* A questão da via de introdução tem sido tambem

réactions d'ordre chimique que la raison nous permettra de prévoir, en rendant le milieu impropre à la vie du bacille infectant.

Encouragée par les belles conquêtes de la sérumthérapie dans la plupart des infections, et en employant des procédés analogues la médecine moderne a tout fait pour la tuberculose; mais, après une courte période d'espérances, tous les résultats ont été négatifs. Ces travaux commencés par les recherches de Richet et Héricourt, enrichis plus tard par Maragliano et Marmoreck, comptent cependant un grand nombre de collaborateurs qui n'ont recueilli que désillusion comme prix de leurs efforts.

La toxinothérapie, proposée par Koch et employée avec plus de soin aujourd'hui qu'elle est mieux connue, donnerait des résultats tout à fait concluants s'il n'y avait un *quia* que les expérimentateurs ne sont pas arrivés à expliquer; à savoir, la propriété qu'ont les organismes tuberculeux de réagir favorablement sous l'effet d'une inoculation de tuberculine; propriété qui, en de certains cas, malheuresement trop rares, transforment l'intervention du médecin en une intervention presque miraculeuse. Mais, l'effet du traitement ne se produit que rarement et l'on compte jusqu'aujourd'hui un grand nombre d'insuccès. Le facteur terrain entre en jeu; lorsqu'il est convenablement modifié, il prépare le succès du traitement spécifique (régime des sanatoriums). Il manque aux tuberculines un je ne sais quoi qui facilite leur action thérapeutique; elles détruisent le tissu tuberculeux, mais le bacille, reste intact, une fois libre.

Le même insuccès général se fait sentir sur le terrain des recherches sur l'immunité de la tuberculose. Si nous considérons les inoculations de cultures de bacilles banaux résistants aux acides jusqu'à celles d'adénopathies scrofuleuses et de cultures de tuberculose atténuées par de nombreux procédés, parmi lesquels celui qui a le plus attiré l'attention des spécialistes, la bovo-vaccine de Behring, nous verrons que ces méthodes prouvent tout au plus la possibilité d'obtenir une augmentation de résistance de l'organisme, soumis à l'inoculation d'une dose de bacilles sûrement infectante. La

explorada; via intra-venoza (Behring), via intestinal (cazo particular da via linfatica) (Calmette), têm dado rezultados que, no emtanto, mostram sempre que a reabsorção do bacilo não se faz facilmente e que na maioria das vezes ella não se observa, permanecendo os bacilos intatos. Isto explica o insucesso da soroterapia ainda que incluidos na celula fagocitaria.

E a razão desse fenomeno existe na estrutura quimica do bacilo, na prezença nelles de substancias que não são assimilaveis normalmente e que protejem o *substratum* vital do germen contra as substancias que o organismo deveria secretar, reajindo assim á infeção, destruindo o elemento invasor.

E' a camada cérea, são os corpos de natureza graxa que existem no microbio da tuberculoze que se opõem á destruição do bacilo; sua função protetora nos é cabalmente revelada pelos metodos de coloração especiais aos acidos rezistentes; junte-se essa função que proteje o bacilo a ganga de hidroceluloze, os toxicos por elle fabricados e cuja natureza complexa tem sempre escapado ás investigações dos observadores, e veremos a razão da produção da celula gigante com todos os carateristicos da lezão tuberculoza reveladas no tuberculo microscopico.

Encarada a essa luz, a infeção tuberculoza se nos aprezenta como molestia local, como a afeção de um orgão. Nelle se devem passar as reações de defeza e isso nol-o mostra não só a clinica, como a experimentação, revelando-nos, de todas as reações a mais facilmente apreciavel — a conjestão peri-tubercular. E' este o primeiro estado do processo de necroze do tuberculo que terminará pela eliminação do tecido morto transformado em puz. A tuberculoze mata pela destruição do tecido nobre do orgão; a terapeutica da tuberculoze deve consistir na destruição do bacilo no interior da celula doente.

Entretanto a infeção tuberculoza é na maioria dos cazos espontaneamente paralizada e frequentes vezes curada, excluzivamente á custa do organismo infetado. E' banal:

question de la voie de l'inoculation a été aussi étudiée: Voie intraveineuse (Behring), voie intestinale (cas particulier de la voie lymphatique), (Calmette) ont donné des résultats prouvant toujours que la résorption du bacille ne se fait pas facilement et qu'on ne l'observe pas le plus souvent: les bacilles demeurent intacts, même inclus dans la cellule phagocytaire. C'est ce qui explique l'insuccès de la sérumthérapie. La raison de ce phénomène provient de la structure chimique du bacille, de la présence en lui de substances qui ne sont pas normalement assimilables et qui protègent le *substractum* vital du germe contre les substances que l'organisme devrait sécréter, de sorte qu'il réagit contre l'infection et que l'élément envahisseur est détruit.

C'est la couche cireuse, ce sont les corps gras du baclle de la tuberculose qui s'opposent à sa destruction; sa fonction protectrice nous est clairement révélée par les méthodes spéciales de coloration résistantes aux acides; ajoutez à cette fonction qui protège le bacille, les toxiques qu'il fabrique, la gangue d'hydrocellulose qui l'enveloppe et dont la nature complexe a toujours échappé aux investigations des observateurs, et nous comprendrons la raison de la production de la cellule géante, avec tous les signes caractéristiques de la lésion tuberculose révélés dans le tubercule microscopique.

Considérée à ce point de vue, l'infection tuberculeuse nous apparait comme une maladie locale, comme l'affection d'un organe. Celui-ci doit présenter des réactions de défense, qui nous sont d'ailleurs révélées par la chimie et l'expérimentation, grâce auxquelles nous observons la réaction la plus facile à observer: la congestion péritubercularie.

C'est là le premier stage du procédé de la nécrose du tubercule, qui se terminera par l'elimination du tissu mort et sa transformation en pus. La tuberculose tue par la destruction du tissu noble de l'organe; la thérapeutique de la tuberculose doit consister dans la destruction du bacille à l'interieur de la cellule malade.

Toutefois, dans la plupart des cas, la tuberculose est paralysée spontanément et souvent même guérie, rien qu'aux dépens de l'organis-

frase a de todas as infeções é a tuberculoze a mais curavel —, e as autopsias confirmamna sempre. E' que o organismo reaje á infeção por dois processos de cura: pela esclerozе do tuberculo ou pela calcificação delle. A evolução da lezão mostra comtudo que a escleroze precede sempre á calcificação. A analize dos tuberculos calcificados mostra que os sais de calcio, fosfato e a cal em natureza se depositam sobre o bacilo em camadas concentricas que o tem por nucleo, abundando no interior desses tuberculos cristais de natureza graxa.

Muitas vezes não se pode mais revelar a existencia de bacilos no interior dos tuberculos calcificados, sinal evidente de sua destruição. A ação esclerojena corre por conta dos toxicos bacilares (ação de tuberculina de Koch; produtos esclerojenos extraidos do bacilo, cloroformobacilina de Auclair), a reação calcificante corre por conta das substancias não reabsorviveis do bacilo (cêras e gorduras) conforme pensamos.

Foi nesse sentido que dirijimos nossas investigações, de acôrdo com a orientação que nos foi fornecida por G. Cruz, nosso mestre.

Suas primeiras experiencias (1900) vizaram obter a reabsorção do bacilo, imunizando os animais por via subcutanea, primeiramente contra as gorduras animais (oleo de figado de bacalháo e gordura humana) mais tarde com as gorduras extraidas do bacilo. Verificou então que se essa reabsorção se dava, era de tal modo lenta que, praticamente, podia ser considerada como não existindo.

De acôrdo com essa verificação poderiamos tentar a reabsorção dos bacilos com o fim de imunização, utilizando-nos da via intestinal, segundo a doutrina de Calmette, rezultado que seria obtido com a saponificação desses corpos pelos sucos pancreaticos, especialmente pela esteapsina, como mostraram Lewkowitsch e Macleod, pelos sais biliares, e talvez ainda pela lipaze do sangue, como se dá com a monobutirina, como rezulta das investigações de Victor Hanriot. Isso entretanto não sucede porque as gorme infecté. «De toutes les infections, la plus facilement guérissable est la tuberculose». C'est, la phrase bien connue, et toujours confirmée par les autopsies. C'est que l'organisme réagit de deux manières contre l'infection: par la sclérose du tubercule ou par sa calcification. L'évolution de la lésion montre, cependant, que la sclérose précède toujours la calcification.

L' analyse des tubercules calcifiés nous prouve que le phosphate de chaux et la chaux en nature se déposent sur le bacille en couches concentriques dont il constitue le noyau; l'intérieur de ces tubercules abonde en cristaux de nature graisseuse.

Souvent on ne peut plus vérifier l'existence de bacilles à l'intérieur des tubercules calcifiés, preuve évidente de leur destruction. L'action sclerogène est attribuée aux toxiques bacillaires (action de la tuberculine de Koch; produits sclérogènes extraits du bacille: chloroformobacilline d'Auclair). La réaction calcifiante est produite, selon nous, par les substances du bacille qui ne se peuvent résorber (cires et graisses). C'est dans ce sens que nous avons dirigé nos recherches, en suivant l'orientation qui nous a été fournie par notre maître G. Cruz.

Dans ses premières expériences, réalisées en 1900, il avait cherché à obtenir la résorption du bacille en injectant les animaux par voie sous-cutané, d'abord avec des graisses animales (huile de foie demorue et graisse humaine) plus tard au moyen des graisses extraites du bacille. Il vérifia alors que cette résorption s'effectuait avec une telle lenteur qu'elle pouvait être considérée pratiquement nulle.

Nous pourrions, en vue de cette vérification, tenter la résorption des bacilles, dans un but d'immunisation, en nous servant de la voie intestinale, selon la doctrine de Calmette, résultat qu'on obtiendrait par la saponification de ces corps par les sucs pancréatiques, en particulier par la stéapsine comme l'ont montré Lewkowitsh et Macleod, par les sels biliaires et peut-être encore par la lipase du sang, comme il arrive avec la monobutyrine, comme on le déduit des investigations de V. Hanriot. Cela n'arrive pourtant pas, parce que les graisses ont leurs ferments spécifiques (Fischer, Pawlow).

duras tem seus fermentos especificos (Fischer, Pawlow).

De acôrdo com essa orientação impunha-se o conhecimento exato da natureza quimica das substancias gordurozas existentes no bacilo da tuberculoze e que de ha muito serviam para explicar o fenomeno da acido-rezistencia que era atribuido unicamente a ellas.

Hammerschlag, no emtanto, já em 1889 reconhecera que no bacilo da tuberculoze existe substancia de natureza albuminoide que possue a propriedade de rezistir aos acidos, quando corada. Modernamente, Auclair e Paris provaram que a acido-rezistencia é fenomeno complexo dependente da acido-rezistencia parcial de diversos componentes do corpo do bacilo.

Com o objetivo de reconhecermos a natureza dessas gorduras procedemos em um aparelho de Sohxlet ao esgotamento de bacilos da tuberculoze esterilizados pelo calôr e secos, tratando-os, sucessivamente, pelos seguintes dissolventes das gorduras: xilol, alcool a 95º, eter e cloroformio. Os bacilos colocados entre duas camadas de algodão de vidro eram sujeitos á ação dos dissolventes, na ordem acima indicada até que se não obtivesse reziduo pela evaporação de 10cc do dissolvente empregado e que era colhido acima do algodão de vidro, e até o ensaio de Lightfood (ensaio de canfora) mostrar-se negativo. Os produtos obtidos apoz o esgotamento eram filtrados em véla de porcelana e os reziduos bacilares examinados ao microscopio. Esses reziduos bacilares permanecem acido-rezistentes até final tratamento pelo cloroformio; o aspeto, porém, dos bacilos modifica-se, aprezentando-se elles mais finos e mais granulozos, como se tivera havido perda de substancias existentes no corpo microbiano intermediarios d'aquellas granulações.

Dos produtos extraidos pelo xilol, um é precipitavel pelo alcool absoluto em excesso. Aprezenta-se sob o aspeto de substancia pulverulenta, branco-amarelada.

Esse precipitado colhido sobre um filtro

Nous avions donc à rechercher quelle était exactement la nature chimique des substances grasiseuses contenues dans le bacille de la tuberculose, lesquelles servaient depuis longtemps à expliquer le phénomène de la résistence aux acides qui leur était exclusivement attribuée.

Cependant, en 1889, Hammerschlag avait déjà vérifié qu'il existe dans le bacille de la tuberculose une substance de nature albuminoide qui possède la propriété de résister aux acides, quand elle est colorée. De nos jours, Auclair et Paris ont prouvé que la résistance aux acides est un phénomène complexe, qui dépend de la résistance partielle aux acides de plusieurs composants du corps du bacille.

Dans le but de reconnaître la nature de ces graisses, nous avons égoutté dans un appareil de Sohxlet les bacilles de la tuberculose stérilisés par la chaleur et secs, en les traitant successivement par les dissolvants qui suivent: xylol, alcool à 95º, éther et chloroforme. Les bacilles placés entre deux couches d'ouate de verre étaient soumis à l'action des dissolvants, dans l'ordre ci-dessus mentionné, jusqu'à ce qu'on n'obtins plus de résidu par l'évaporation de 10 cc. du dissolvant employé et qui était recueilli sur l'ouate de verre, et que l'essai de Lightfood (essai du camphre) donnât un résultat négatif. Les produits obtenus après l'égouttement étaient filtrés à travers une bougie de porcelaine et les résidus bacillaires examinés au microscope. Ces résidus se conservent résistants aux acides jusqu'au traitement final par le chloroforme; mais l'aspect des bacilles se modifie, ils deviennent plus minces et plus granuleux, comme s'il y avait eu une perte dans le corps microbien de substances intermédiaires entre ces granulations.

L'un des produits extraits par le xylol donne un précipité, avec l'alcool en excès. Ce précipité a l'aspect d'une substance pulvérulente, d'un blanc jaunâtre; une fois recueilli sur un filtre et traité par l'éther, il se dissout en partie; il reste sur le filtre un résidu insoluble dans le chloroforme.

Si l'on examine au microscope le précipité obtenu de la façon ci-dessus décrite, il appa-

e tratado pelo eter dissolve-se em parte; sobre o filtro permanece um reziduo insoluvel no eter e soluvel no cloroformio.

O precipitado obtido como acima dissemos, examinado ao microscopio aprezenta-se como constituido por pequenos granulos refrinjentes (Obj. C e E, Zeiss Oc. 3). Córase pelo Ziehl e reziste aos acidos. E' insoluvel na agua destilada, agua alcalinizada e alcool, quer a frio, quer nos respetivos pontos de ebulição. Decompõe-se pelo tratamento com o acido azotico ao terço, fervente, dando produção de gorduras reconheciveis pelo *Sudão.*

A saponificação dessa substancia pela soda alcoolica mostrou tratar-se de uma cêra em cuja constituição entra um alcool izomero da colesterina, porém diferente da izocolesterina e fitosterina.

A separação da porção soluvel no eter da que é soluvel no cloroformio mostra, pela evaporação dos referidos veiculos dois produtos de aspeto diverso: branco-amarelado a porção soluvel no eter, mais escura a porção soluvel no cloroformio. A primeira é uma cêra, a segunda não poude ainda ser caraterizada, dada a pequena quantidade obtida. Esses dois produtos diferem ainda pelo ponto de fuzão. A cêra soluvel no eter funde a 54,°5 C, o produto soluvel no cloroformio tem para ponto de fuzão 193o C.

O xilol de onde fôra precipitada a cêra pelo alcool absoluto, libertado desse alcool e tratado pela agua, deixa precipitar uma substancia soluvel no eter. Pela evaporação desse dissolvente, cristaliza em tufos de agulhas sedozas. E' saponificavel pela soda alcoolizada e sendo fundida em estado cristalino aprezenta-se, apoz a fuzão, sob o aspeto de massas escamozas, nacaradas. A cristalização indica acido palmitico. Si em vez de tratarmos pela agua evaporarmos o xilol em B. M. obter-se-á um produto, que, pelo resfriamento se solidifica com aspeto gordurozo, de côr amarela avermelhada. Tem o cheiro de tuberculina um pouco alterado aproximando-se do cheiro de mel de abelhas e

rait comme constitué par de petits granules réfringents (Obj. C e E, Zeiss oc. 3). Il se colore sous l'action du Ziehl, résiste aux acides et reste insoluble dans l'eau distillée, l'eau alcoolisée et l'alcool, soit à froid, soit à leur point d'ébullition. Il se décompose sous l'action de l'acide azotique au tiers, bouillant, et produit alors des graisses reconnaissables par le *Soudan.*

La saponification de cette substance par la soude alcoolique a montré qu'il s'agissait d'une cire dans la constitution de laquelle il y a un alcool isomérique de la cholestérine différent, toutefois, de l'isocholestérine et de la phytostérine.

La séparation de la partie soluble dans l'éther d'avec celle qui est soluble dans le chloroforme nous montre, par l'évaporation des véhicules deux produits d'aspect différent: la partie soluble dans l'éther laisse un résidu blanc jaunâtre; le résidu de l'autre partie est plus foncé. La premier est une cire; quant au second, la quantité obtenue est si petite qu'on n'a encore pu la determiner. Ces deux produits diffèrent encore par leur point de fusion. La cire soluble dans l'éther fond à 54,o5 C.; le point de fusion du produit soluble dans le chloroforme est 193o C.

Le xylol, d'où la cire a été précipitée par l'alcool absolu, une fois dêlivré de cet alcool et traité par l'eau, laisse précipiter une substance soluble dans l'éther. Par l'évaporation de ce dissolvant, elle cristallise en touffes d'aiguilles soyeuses et peut être saponifié par la soude alcoolique; une fois fondu à l'état cristallin, elle se présente, après la fusion, sous l'aspect de masses écaillées et nacrées. Sa cristallisation indique un acide palmitique. Si, au lieu de le traiter par l'eau, on fait évaporer le xylol en B. M. on obtient un produit qui, en se refroidissant, se solidifie et prend l'aspect d'un corps gras, d'un jaune rougeâtre. Il a une odeur de tuberculine un peu alterée, qui rappelle le parfum du miel et a une saveur âcre très prononcée. Il fond à 53o5, se solidifie à 52o C. et est soluble dans les dissolvants des graisses. L'épreuve de Lightfood donne un résultat positif, et ne révèle pas la présence de graisses dans les autres dissol-

sabôr acre muito pronunciado. Funde a 53o5, e solidifica-se a 52o C; é soluvel nos dissolventes das gorduras. O ensaio de Lightfood dá rezultado pozitivo. Esse mesmo ensaio não revela gorduras nos outros dissolventes empregados (alcool, eter e cloroformio). O cloroformio extrae dos bacilos uma lecitina precipitavel pela agua.

Retomando os bacilos desengordurados e córando-os pelo metodo de Ziehl verificamos que permanecem acido-rezistentes o que está de acôrdo com o que tinha sido observado por Auclair e Paris. Isto nos levou a investigar um metodo de coloração diferencial entre os bacilos da tuberculoze e os pseudo-tuberculozos. Entre estes a acido-rezistencia é tambem relativa e varía, desde o tempo de cultura, até a orijem do bacilo estudado. A dificuldade consistia, pois, em encontrarmos um ajente descorante capaz de produzir os seus efeitos sobre os para-tuberculozos, poupando o bacilo da tuberculoze verdadeira. Outro caminho seria acharmos uma materia corante eletiva que os diferenciasse nitidamente.

Si apoz a ação descorante da mistura de alcool absoluto 1 parte e acido acetico 2 partes fizermos o Gram sobre o preparado, os bacilos paratuberculozos tomarão intensamente a côr bazica, aprezentando volumozas granulações condensadas. Os bacilos da tuberculoze se comportam de maneira diversa; conservar-se-ão corados em vermelho e, as granulações intensamente coradas pelo violeta de genciana, aprezentar-se-ão esparsas. Córando um preparado de tuberculoze e de pseudo-tuberculoze pelo Ziehl e descorando-o rapidamente por uma solução acida (acido azotico ao terço, acido sulfurico ao quarto) si o tratarmos por uma solução aquoza de azul de metilenio e si fizermos sobre esta ajir uma solução de acido picrico, o azul precipitará sob forma cristalina.

Esses cristais são soluveis na agua, pouco soluveis no alcool etilico e bastante soluveis no alcool metilico. Si examinarmos então o preparado veremos que os bacilos se-aprezentam mais descorados em relação

vants employés (alcool, éther et chloroforme). Le chloroforme extrait des bacilles une lécithine qui donne avec l'eau un précipité.

En reprenant les bacilles privés maintenant de graisse et en les colorant par la méthode de Ziehl, nous vérifions qu'ils se conservent résistants aux acides, ce qui est d'accord avec les observations d'Auclair et Paris. Cela nous a conduits à chercher une méthode de coloration différentielle entre les bacilles de la tuberculose et les pseudo-tuberculeux. Parmi ceux-ci, la résistance aux acides est aussi relative et varie dès le temps de culture jusqu'à l'échantillon du bacille étudié. La difficulté consiste donc à trouver un agent décolorant capable de produire son effet sur les paratuberculeux, tout en épargnant le bacille de la vraie tuberculose. Nous pourrions aussi tâcher de trouver une matière colorante élective qui les différentie nettement.

Si, après l'action décolorante du mélange de 1 partie d'alcool absolu et 2 parties d'acide acétique sur une préparation colorée par le Ziehl nous faisons le Gram, les bacilles paratuberculeux prendront entièrement la couleur violette, en présentant de volumineuses granulations condensées. Les bacilles de la tuberculose se comportent d'une façon différente. Ils conservent la couleur rouge, et les granulations fortement colorées par le violet de gentiane, apparaitront disséminées. En colorant une préparation de tuberculose et de pseudo-tuberculose par le Ziehl et en la décolorant rapidement par une solution acide (acide azotique au tiers, acide sulfurique au quart) et si nous la traitons par une solution aqueuse de bleu de methylène dans laquelle verse une solution d'acide pricrique, le bleu se deposera sous la forme cristalline. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool ethylique et assez solubles dans l'alcool methylique. Si nous examinons alors la préparation, nous verrons que les bacilles se présentent plus décolorés, par rapport au Ziehl, qu'avant l'action de l'acide picrique et que, parmi les pseudo-tuberculeux, quelques uns apparaissent colorés en violet. On comprend que l'acide picrique ait provoqué une décoloration plus énergique, non

ao Ziehl que antes da ação do acido picrico e que os pseudo-tuberculozos se aprezentam alguns córados em violeta. Compreende-se que o acido picrico tenha determinado esse descoramento mais enerjico, não só por sua função de acido, como por deslocar o Cl da molecula do azul de metilenio.

Restava investigar si o picrato de azul de metilenio precipitado possuia propriedade de coloração eletiva para os pseudo-tuberculozos.

A mistura da solução de Ziehl e emulsão concentrada em glicerina e agua do picrato de azul de metilenio, aprezenta a particularidade interessante de córar a quente em vermelho, especificamente, os acido-rezistentes (tuberculoze ou pseudo-tuberculoze) ao passo que o nucleo das celulas do material examinado e os outros bacterios que ahi possam existir (caso particular do escarro) coram-se em violeta. O protoplasma das celulas conserva-se rozeo. A diferenciação faz-se pelo alcool-acetona.

O tratamento pelo Lugol, apoz a ação da mistura acima referida, parece modificar as condições de coloração do preparado. Conseguimos, assim, o descoramento completo de algumas amostras de pseudo-tuberculoze apoz a ação do Lugol e alcool-acetona. Nessas condições a tuberculoze conserva-se vermelha com granulações violetas, todo o resto da preparação descora-se dando lugar a que se proceda á coloração do fundo por qualquer côr de contraste.

Melhor rezultado observámos, porém, uzando em vez do picrato de azul de metilenio, o cristal violeta ou a violeta de genciana fenicados. Essas côres aprezentam um gráo maior de eletividade para as granulações dos bacilos.

Esse metodo nos deu magnificos rezultados, trazendo real vantajem no diagnostico diferencial. O alcool-acetona, que é o descorante empregado, mostra-se capaz de libertar os pseudo-tuberculozos da fucsina, ao passo que os tuberculozos verdadeiros a conservam, aprezentando-se córados em vermelho. As granulações coradas em violeta contrastam seulement parcequ'il agit comme acide mais aussi il sépare le Cl de la molécule du bleu de methylène.

Il restait à voir si le picrate du bleu de methylène, une fois précipité, possédait la propriété de coloration élective vis à vis des pseudo-tuberculeux.

Le mélange de la solution de Ziehl avec l'émulsion concentrée du picrate de bleu de methylène en glycérine et eau présente l'intéressante particularité de colorer en rouge, à chaud, spécifiquement, les bacilles résistants aux acides (tuberculose ou pseudo-tuberculose) tandis que le noyau des cellules du matériel examiné et les autres bactéries qui peuvent par hasard s'y trouver (cas particulier du crachat) se colorent en violet. Le protoplasme des cellules conserve une teinte rosée. La differentiation s'établit par l'alcool-acétone.

Le traitement par le Lugol, après l'action du mélange dont nous venons de parler, semble modifier les conditions de coloration de la préparation. Nous avons obtenu ainsi la décoloration complète de quelques échantillons de pseudo-tuberculose sous l'action du Lugol et de l'alcool-acétone. Dans ces conditions, la tuberculose reste rouge, avec des granulations violettes; tout le reste de la préparation se décolore, en permettant la coloration du fond, par une couleur quelconque.

Nous avons obtenu un meilleur résultat en employant au lieu du picrate de bleu de méthylène le cristal violet ou le violet de gentiane phéniqués. Ces couleurs ont une plus grande force d'électivité pour les granulations des bacilles.

Cette méthode nous a donné des très beaux résultats, en produisant un réel avantage dans le diagnostic différentiel. L'alcool acétone, qui est le décolorant employé, est capable de faire disparaître la fuchsine des pseudo-tuberculeux, tandis que les vrais tuberculeux la conservent, et présentant une couleur rouge. Les granulations colorées en violet ressortent admirablement à l'intérieur des bacilles. Le bleu de méthylène est très bon pour la coloration du fond.

En un mot, nous proposons la méthode suivante comme la meilleure pour la différen-

admiravelmente no interior dos bacilos. O azul de metilenio presta-se muito bem para a coloração do fundo.

Propomos, em rezumo, como metodo de escolha na diferenciação microscopica entre os bacilos da tuberculoze e os pseudo-tuberculozos, o seguinte:

A) Córar a quente pela fucsina fenicada de Ziehl, cerca de 2 minutos.
Lavar em agua corrente.

B) Córar pelo cristal violeta fenicado, durante 2 minutos.

C) Tratar pelo Lugol.

D) Descorar pela mistura:
Alcool absoluto 2 partes.
Acetona 1 parte.
Lavar — Córar por uma côr de contraste (azul de metilenio em solução aquoza).

As soluções uzadas em A e B podem ser empregadas em um só tempo, sendo misturadas em partes iguais. As preparações assim feitas são, no entretanto, menos nitidas.

Os bacilos da tuberculoze aprezentam-se *córados em vermelho,* mostrando em seu interior *granulações esparsas,* intensamente coradas em violeta.

Os paratuberculozos aprezentam-se *córados em violeta sem orla vermelha,* mostrando granulações *condensadas.*

Os microbios de associação (escarro, puz, etc.): pneumococos, stafilococos, streptococos, etc. tomarão o Gram e os outros serão revelados pela côr de contraste (azul de metilenio). O mesmo sucederá aos elementos constituintes do material examinado.

Acabamos de ver que, si tratarmos o bacilo da tuberculoze em condições adequadas pelo metodo de Gram suas granulações aprezentam a propriedade de reter enerjicamente a materia córante. Si em preparados córados a quente pelo Ziehl e assim fortemente impregnados empregarmos o Gram, mesmo sem lavajem da lamina para a retirada do excesso de fucsina, as granulações aprezentar-se-ão intensamente córadas em violeta.

tiation microscopique entre les bacilles de la tuberculose et les pseudo-tuberculeux:

A) Colorer à chaud par la fuchsine phéniquée de Ziehl, deux minutes environ.
Laver dans l'eau courante.

B) Colorer par le cristal violet phéniqué, pendant 2 minutes.

C) Traiter par le Lugol.

D) Décolorer par:
Alcool absolu 2 parties.
Acétone 1 partie.
Laver — Colorer avec une couleur de contraste (bleu de méthylène en solution aqueuse).

Les solutions dont on se sert pour A et B peuvent être employées en même temps, mélangées, en parties égales; mais les préparations sont, en ce cas, moins nettes.

Les bacilles de la tuberculose auront une *coloration rouge,* avec, à l'interieur, des granulations fortement colorées en violet.

Les para-tuberculeux apparaissent *colorés en violet,* et montrent des granulations condensées.

Les microbes d'association (crachat, pus, etc.): pneumocoques, staphylocoques, streptocoques etc. prendront le Gram et les autres seront révélés par la couleur de contraste (bleu de méthylène). Il en sera de même pour les éléments constitutifs du matériel examiné.

Nous venons de voir que si nous traitons le bacille de la tuberculose dans des conditions adéquates, par la méthode de Gram, ses granulations présentent la propriété de retenir énergiquement la matière colorante. Si, dans des préparations colorées à chaud par le Ziehl et, par suite, fortement teintées, nous employons le Gram, même sans laver, pour retirer l'excès de fuchsine, les granulations apparaitront entièrement colorées en violet. Il en sera de même si cette coloration est faite en sens inverse: les granulations se colorent en violet et le reste du bacille en rouge. Cette séconde méthode ne donne cependant pas des préparations aussi nettes que la première. Il en sera de même si nous faisons le mélange des matières colorantes sur la lame, colorée à chaud, après l'action du Lugol si nous faisons la décoloration par l'alcool absolu ou l'alcool acétone.

leta. O mesmo sucederá si essa coloração fôr feita em sentido inverso: as granulações córam-se em violeta e o resto do bacilo em vermelho. Esse segundo modo de proceder não dá, comtudo, preparações tão nitidas quanto o primeiro. O mesmo sucederá ainda, si fizermos a mistura das materias corantes e sobre a lamina córada a quente, apoz a ação do Lugol descorarmo-la pelo alcool absoluto ou alcool acetona.

Por outro lado, si em preparações córadas pelo Ziehl fizermos ajir rapidamente o cristal violeta, nem todas as granulações tomam a materia corante; vêm-se, então, no corpo do bacilo, intensamente córado em vermelho, pontos refrinjentes, brilhantes, que reprezentam as granulações não córadas. Infere-se disso que essas granulações tem maior eletividade para a materia corante do metodo de Gram do que para a fucsina e que não se trata de uma superpozição de côres e sim de uma propriedade eletiva.

Um outro argumento rezulta da observação de espaços menos córados nos bacilos coloridos só pelo Ziehl e que antigamente eram considerados diversamente como esporios ou como vacuolos.

Nas culturas homojeneas de tuberculoze onde a biolojia do bacilo é fortemente modificada, em virtude de adaptação forçada a essa nova condição de vida, as granulações prestam-se muito para estudo, especialmente nas formas ramozas ou actinomicozas.

Aprezentam-se aí como granulos (oc. comp. 12, Zeiss) incluidos em um espaço bem limitado, de contornos nitidos. A's vezes fazem saliencia no limite externo do bacilo, como se devessem em breve ser espulsos, o corpo do bacilo aprezenta-se mais grosso e a substancia que se córa em vermelho e que envolve diretamente o granulo mostra-se mais delgada; entre elle e o corpo bacilar nota-se pequena orla clara.

O numero dessas granulações varia de 1 a 6 em cada bacilo; raras vezes atinge a 8 ou a 10, o que sómente observamos em culturas homojeneas de mais de mez. Quando unica, aprezenta-se geralmente no centro do

D'un autre côte si nous faisons agir rapidement le cristal violet sur des préparations colorées par le Ziehl, toutes les granulations ne souffrent pas l'effet de la matière colorante; on voit alors dans le corps du bacille entièrement coloré en rouge, des points réfringents, brillants, qui sont les granulations non colorées. On en déduit que ces granulations ont une plus grande électivité pour la matière colorante de la méthode de Gram que pour la fuchsine et qu'il ne s'agit pas d'une superposition de couleurs, mais bien d'une propriété élective.

On tire un nouvel argument de l'observation des parties moins colorées chez les bacilles colorés uniquement par le Ziehl et qui étaient autrefois considérées, soit comme des spores, soit comme des vacuoles.

Dans les cultures homogènes de tuberculose, où la biologie du bacille est profondément modifiée, en vertu de son adaptation forcée à cette nouvelle condition d'existence, les granulations servent bien mieux à l'étude, surtout s'il s'agit des formes ramifiées ou actinomycosiques.

Elles se présentent, alors, comme des granulations (oc. comp. 12, Zeiss) occupant un espace bien délimité, aux contours nets. Elles forment parfois saillie dans le corps du bacille, comme si elles devaient bientot en être expulsées; le corps du bacille est plus gros, et la substance qui se colore en rouge et entoure directement le granule, plus mince; on peut voir un petit ourlet clair entre elle et le corps du bacille.

Le nombre de ces granulations varie de 1 à 6 par bacille; il n'atteint que rarement 8 ou 10, ce qu'on n'observe, d'ailleurs, que dans les cultures homogènes de plus d'un mois. Lorsqu'elle est unique elle apparait, généralement, au centre du bacille ou à l'un de ses pôles; quand il y en a deux, chacune occupe, en général, l'une des extrémités du bacille; dans les autres cas, elles se disposent en série, rectiligne ou infléchie, selon le plan d'orientation du bacille.

Dans les formes bacillaires désagrégées — comme on l'observe aussi dans des cultures anciennes — les granulations se présentent

bacilo ou em um dos seus pólos; quando duas ocupa geralmente cada uma, um dos pólos do bacilo; nos outros cazos dispõem-se em serie retilinea ou incurvada, seguindo o plano de orientação do bacilo.

Nas formas bacilares dezagregadas, como sucede observar-se em culturas antigas, as granulações aprezentam-se, ás vezes, dispostas umas em seguimento ás outras, como streptococos, outras vezes esparsas, izoladas.

Nas culturas recentes em batata, na tuberculoze virulenta, modifica-se o aspeto dessas granulações que se mostram muitissimo menores. O mesmo se observa, fazendo-se seu estudo comparativo nos escarros de individuos não cavernozos e no dos tuberculozos antigos, cavitarios.

Essa diferença é mais sensivel nos escarros de tuberculozos sujeitos ao tratamento pela tuberculina, por muito tempo. Nestes ultimos chega-se mesmo a não se encontrar mais bacilos revelaveis pelo Ziehl, ao passo que as granulações raramente faltam e a inoculação na cobaia revela a existencia de tuberculoze.

O mesmo sucede no puz tuberculozo, como no cazo dos abcessos frios e a forma granular recentemente descrita por Muchs encontra nisso a sua explicação. Daí o inferir-se ser a forma granular, senão forma de rezistencia caracteristica, pelo menos a forma de maior rezistencia que o bacilo da tuberculoze possa tomar.

A auzencia de bacilos da tuberculoze caraterizaveis pelo Ziehl no puz dos abcessos tuberculozos; a existencia no puz tuberculozo de granulações e de bacilos revelaveis pelo metodo de Gram e a eletividade das granulações do bacilo para esse metodo de coloração, foram razões que determinaram verificassemos si nos ganglios tuberculozos havia formação de uma substancia capaz de modificar a estrutura do bacilo da tuberculoze ou mesmo de destruil-o.

Com esse intuito procedemos *in vitro* ás seguintes experiencias: Ganglios cazeozos de cobaias tuberculizadas com tuberculoze humana foram triturados e macerados em agua

parfois les unes à la suite des autres, comme des streptocoques; elles sont parfois isolées, disséminées.

Dans les cultures récentes en pomme de terre, dans la tuberculose virulente, l'aspect de ces granulations est modifié; elles sont alors beaucoups plus petites. On peut faire les mêmes observations en les comparant dans les crachats d'individus non caverneux et dans ceux de tuberculeux anciens, cavitaires.

Cette différence est plus sensible dans les crachats des tuberculeux soumis pendant longtemps au traitement par la tuburculine. On arrive même, chez ces derniers, à ne plus trouver de bacilles qui puissent être révélés par le Ziehl, tandis que les granulations ne font que rarement défaut et que l'inoculation révèlé, chez les cobayes, l'existence de la tuberculose.

On observe les mêmes phénomènes dans le pus tuberculeux, ainsi que dans le cas des abcès froids, et c'est là que la forme granulaire décrite dernièrement par Muchs trouve son explication.

D'où l'on a déduit que la forme granulaire est, sinon la forme de résistance caractéristique, tout au moins la forme la plus résistante que puisse prendre le bacille de la tuberculose.

L'absence de bacilles de la tuberculose déterminables par le Ziehl dans le pus des abcès tuberculeux; l'existence dans ce pus tuberculeux des granulations et de bacilles que nous révèle la méthode de Gram, et l'électivité des granulations du bacille pour cette méthode de coloration, telles sont les raisons qui nous ont poussés à vérifier s'il se formait dans les ganglions tuberculeux une substance capable de modifier la structure du bacille de la tuberculose ou même de le détruire.

Dans ce but, nous avons procédé *in vitro* aux expériences suivantes: Des ganglions caséeux de cobayes tuberculisés avec de la tuberculose humaine ont été triturés et mis en macération dans de l'eau physiologique glycérinée à 10 % et phéniquée à 0,5 %. Cette émulsion a éte divisée en deux parties qui sont restées dans l'étuve à 38° c., l'une pendant 48 heures et l'autre pendant 72.

Au bout de ce temps, les émulsions ont

fiziologica glicerinada a 10 % e fenicada a 0,5 %. Essa emulsão foi dividida em duas porções que permaneceram na estufa a 38º c uma, durante 48 horas e outra durante 72 horas.

Findos esses prazos foram as emulsões filtradas em algodão e o filtrado uzado então em nossos ensaios.

Como testemunhas empregámos ganglios de cobaias infetadas com tripanozomas, que provocam forte reação ganglionar, e como consequencia, adenopatias volumozas. Essas cobaias eram consideradas normais em relação ás infetadas com tuberculoze. Esses ganglios eram igualmente triturados e emulcionados em agua fiziolojica glicerinada e fenicada e postos a macerar em condições identicas aos ganglios tuberculozos.

Por outro lado, nos utilizavamos de emulsão de bacilos de tuberculoze feita em veiculo identico ao empregado para os extratos ganglionares, para servir de testemunha ao extrato de ganglios normais.

Eram as emulsões ganglionares postas em contato com os bacilos tuberculozos, obedecendo á tecnica abaixo descrita.

As contajens foram feitas com oc. 12 Zeiss em laminas coradas pelo metodo que propónho neste trabalho, uzando no entretanto como descorante sómente o alcool absoluto.

As preparações das emulsões bacilares que continham extrato de ganglios tuberculozos eram feitas em uma extremidade da lamina; a outra extremidade era ocupada pela preparação da emulsão que continha o extrato de ganglio normal. Assim ficavam as preparações testemunhas em condições identicas de experimentação.

Para maior facilidade adotámos a seguinte notação no correr da experimentação:

e. g. t. = extrato de ganglios tuberculozos.
e. g. n. = extrato de ganglios normais.
e. b. t. = emulsão de bacilos da tuberculoze.
v. = veiculo (agua fiziolojica glicerinada a 10 % e fenicada a 0,5 %.

été filtrées à travers de l'ouate et le résidu employé dans nos expériences.

Nous nous sommes servi, comme témoins de ganglions de cobayes infectés par des trypanosomes qui provoquent une forte réaction ganglionnaire et, en conséquence, de volumineuses adénopathies. Ces cobayes étaient considérés normaux par rapport aux cobayes infectés par la tuberculose. Ces ganglions étaient également triturés et émulsionnés dans de l'eau physiologique, glycérinée et phéniquée, et la macération etait faite dans des conditions identiques à celles des ganglions tuberculeux.

D'un autre côté, nous nous sommes servis d'une émulsion de bacilles de la tuberculose faite dans les mêmes véhicules employés pour les extraits ganglionnaires, pour servir de témoin à l'extrait des ganglions normaux.

Les émulsions ganglionnaires êtaient mises en contact avec les bacilles tuberculeux, d'après le procédé que nous avons décrit.

Les comptages ont été faits avec l'oc. 12 Zeiss sur des lames colorées par la méthode proposée ci-dessus, mais en n'employant comme décolorant que l'alcool absolu.

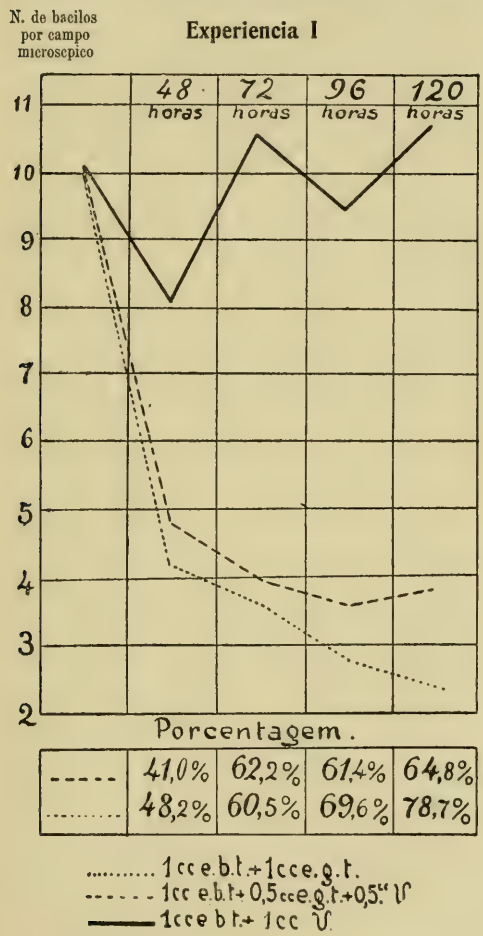
Les préparations des émulsions bacillaires qui contenaient de l'extrait des ganglions tuberculeux étaient faites sur l'extrémité d'une lame; à l'autre extrémité se trouvait la préparation de l'émulsion qui contenait l'extrait du ganglion normal. Les préparations témoins se sont ainsi trouvées dans des conditions identiques d'expérimentation.

Pour simplifier la chose, nous avons adopté la notation suivante au cours de l'expérimentation:

e. g. t. = extrait de ganglions tuberculeux.
e. g. n. = » » » normaux.
e. b. t. = émulsion de bacilles de la tuberculose.
v. = véhicule (eau physiologique glycérinée à 10 % et phéniquée à 0,5 %.

Nous avons employé la technique suivante: Les extraits ganglionnaires étaient mélangés avec une émulsion de bacilles de tuberculose humaine faite dans de l'eau physiologique glycérinée à 10 % et phéniquée à 0,5 % dans les proportions suivantes:

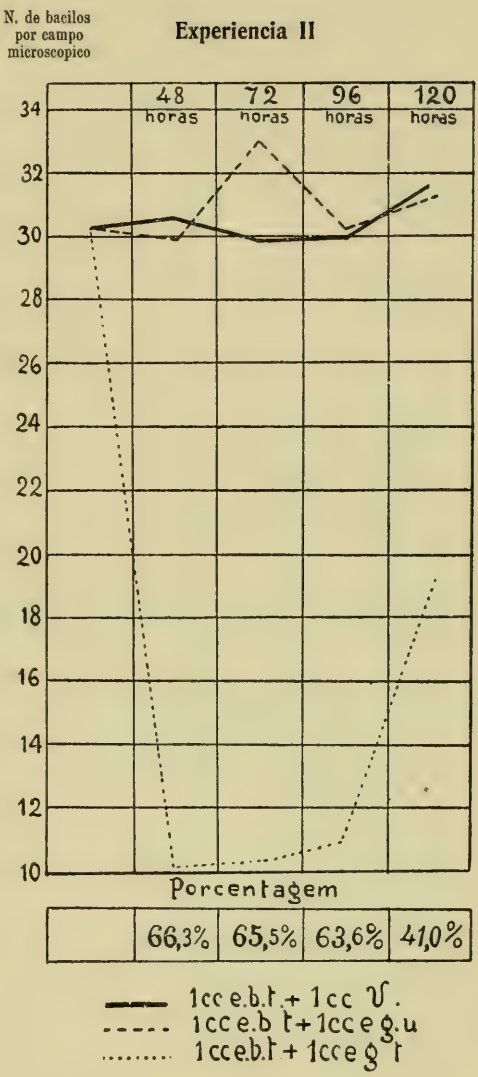
Uzámos da seguinte tecnica: Os extratos ganglionares eram misturados a uma emulsão de bacilos de tuberculoze humana feita em agua fiziolojica, glicerinada a 10 % e fenicada a 0,5 %, na seguinte proporção:



Experiencia I

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
1 cc e. b. t. + 5 cc e. g. t. + 5 cc v.
1 cc e. b. t. + 1 cc v. (testemunha).

Essas misturas, colocadas em tubos arrolhados com rolhas de borracha permaneciam na estufa a 38º c., sendo ajitadas diariamente e no momento de se fazerem as preparações para as contajens.



Expérience I

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
1 cc e. b. t. + 5 cc e. g. t. + 5 cc v.
1 cc e. b. t. + 1 cc v. (témoin).

Ces mélanges étaient placés dans des tubes recouverts d'un bouchon en caoutchouc et restaient dans une étuve à 38º C. On les agitait tous les jours et au moment de faire les préparations pour les comptages.

Experiencia II

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. n. (testemunha).
1 cc e. b. t. + 1 cc v. (testemunha).

Procedeu-se de modo identico ao da Experiencia I.

Pelo exame desses rezultados vemos que o produto da extração dos ganglios normais não exerce ação sobre os bacilos da tuberculoze; por outro lado, os ganglios tuberculozos cazeificados contêm uma substancia cuja ação se exerce até 120 horas de contato (Exp. I). O pequeno aumento observado no numero de bacilos entre 96 a 120 horas depois (Exp. II) pode ser explicado por dezagregação de algum grumo bacilar.

Tratámos, então, de verificar si essa substancia seria reativada:

A) Pela adição de maior quantidade de e. g. t.
B) Pela adição de sôro fresco de cobaia nova.

A) Ao tubo que continha 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. n. juntou-se 1 cc de e. g. n. (tubo a); ao tubo que continha 1 cc de e. b. t. + 1 cc de e. g. t. juntou-se 1 cc de e. g. t. tubo b).

Médias das contajens feitas 24 horas depois da permanencia na estufa a 38º c.

Tubo a) = 23,04.
Tubo b) = 13,85.

Relações entre as contajens feitas antes e depois da nova adição de emulsões ganglionares:

e. g. n. $\frac{31.1}{17.9} = 1{,}73$ e. g. t. $\frac{23.4}{13.8} = 1{,}69$

B) A 0,75 cc do tubo *a* juntou-se 0,05 cc de agua fiziolojica + 1 cc de sôro fresco de cobaia nova tubo a).
A 0,75 cc do tubo *b* juntou-se 0,05 cc de agua fiziologica + 1 cc de sôro fresco de cobaia nova (tubo b).

Médias obtidas 48 horas depois da ação do sôro á temperatura de 38º c.

Tubo a) = 10,9 bacilos por campo.
Tubo b) = 06,2 » » »

Expérience II

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. n. (témoin).
1 cc e. b. t. + 1 cc v. (témoin).

On a agi de façon identique à celle de l'Expérience I.

Voici les résultats obtenus:

Nous voyons par l'examen de ces résultats que le produit de l'extraction des ganglions normaux n'a pas d'influence sur les bacilles de la tuberculose; d'un autre côté, les ganglions tuberculeux caséifiés contenaient une substance dont l'action se fait sentir jusqu'à 120 heures de contact (Exp. I). La petite augmentation observée dans le nombre de bacilles de 96 à 120 (Exp. II) peut s'expliquer par la désagrégation d'un grumeau bacillaire.

Nous avons ensuite tâché de vérifier si cette substance pouvait être réactivée:

A) Par l'addition d'une plus grande quantité de e. g. t.
B) Par l'addition de sérum frais d'un cobaye jeune.

A) Au tube qui contenait 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. n. on a ajouté 1 cc de e. g. n. (tube a); au tube qui contenait 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. t. on a ajouté 1 cc de e. g. t. (tube b).

Moyennes des comptages effectués 24 heures après une permanence dans l'étuve à 38º c.

Tube a) = 23,04.
Tube b) = 13,85.

Rapports entre les comptages effectués avant et après la nouvelle addition d'émulsions ganglionnaires:

e. g. n. $\frac{31.1}{17.9} = 1{,}73$ e. g. t. $\frac{23.4}{13.8} = 1{,}69$

B) A 0,75 cc du tube *a* on a ajouté 0,05 cc d'eau physiologique + 1 cc de sérum frais de cobaye (tube a).
A 0,75 cc du tube *b* on a ajouté 0,05 cc d'eau physiologique + 1 cc de sérum frais de cobaye (tube b).

Moyennes obtenues 48 heures après l'action du sérum, à la température de 38º c.

Tube a) = 10,9 bacilles par champ.
Tube b) = 6,2 » » »

Relações obtidas pelas contajens feitas antes e depois da ação do sôro:

antes $\frac{23,4}{13,8} = 1,73$ relação entre *a* e *b*

depois $\frac{10,9}{06,2} = 1,79$ relação entre a) e b)

o que indica não ser essa substancia reativada por adição de maior quantidade della, nem pelo sôro de cobaia nova.

O aquecimento entre 65 e 70° c., durante 1 hora destróe essa substancia. E' o que rezulta da seguinte tabela:

	N. de bacilos por campo		
	24 h.	48 h.	72 h.
Tubo 1: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t.	6,12	2,03	03,02
» 2: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t. (aquecido entre 65 e 70°, durante 1 hora)	9,03	22,00	13,00
Tubo 3: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. n.	11,04	10,45	13,03

Restava indagar si essa substancia, que até então se comportava como fermento, exercia sua ação sobre as cêras incluidas no corpo do bacilo.

Utilizámo-nos, então, de ganglios tuberculozos cazeozos de boi de onde extraimos a substancia ativa do seguinte modo: determinado pezo de ganglios tuberculozos cazeozos triturados era emulsionado em 5 vezes o seu pezo de agua fiziolojica glicerinada a 10 % e fenicada a 0,5 %, sua emulsão permaneceu na estufa por trez dias, sendo depois reduzida em B. M. a 38° C. ao decimo de volume. Depois da emulsão passada em tamiz procede-se á separação dos elementos solidos em suspensão, por centrifugação. A parte liquida, separada por decantação encerra a substancia ativa e deve ser conservada ao abrigo do ar e da luz.

Tomando uma pequena porção desse extrato glicerinado e tratando-o pelo alcool absoluto forma-se um precipitado que, lavado sobre filtro de papel repetidas vezes pelo alcool para acarretar as substancias gordurozas nelle soluveis, se redissolve facilmente em agua fiziolojica.

Essa substancia em solução mostra ação francamente saponificante sobre a cêra ex-

Rapports obtenus par les comptages effectués avant et après l'action du sérum:

avant $\frac{23,4}{13,8} = 1,73$ rapport entre *a* et *b*

après $\frac{10,9}{6,2} = 1,79$ rapport entre a) et b)

ce qui prouve que cette substance n'est pas «reactivée» par l'addition d'une plus grande quantité d'elle-même, ni par le sérum de cobaye.

Le chauffage de 65 à 70° c, pendant 1 heure, détruit cette substance. C'est ce qu'on déduit du tableau suivant:

	N. de bacilles par champ		
	24 h.	48 h.	72 h.
Tube 1: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t.	6,12	2,03	3,02
» 2: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t. (chauffé pendant 1 heure, de 65 à 70°)	9,03	22,00	13,00
Tube 3: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. n.	11,04	10,45	13,03

Il nous restait à chercher si cette substance qui agissait, jusqu'alors, comme un ferment, exerçait son action sur les cires contenues dans le corps du bacille.

Nous nous sommes alors servi de ganglion tuberculeux caséeux de bœuf d'où nous extrayions la substance active comme suit: Une certaine quantité de ganglions tuberculeux caséeux triturés était émulsionnée en 5 fois son poids d'eau physiologique glycérinée à 10 % et phéniquée à 0,5 %. Cette émulsion est restée trois jours dans l'étuve; après, elle a été réduite au B. M., à 38° C, au dixième de son volume. Après avoir passé l'émulsion au tamis, on a séparé les éléments solides en suspension par centrifugation. La partie liquide, séparée par décantation referme la substance active et doit être conservée à l'abri de l'air et de la lumière.

En prenant une petite quantité de cet extrait glycériné et en le traitant par l'alcool absolu, il se forme un précipité qui, après avoir été lavé plusieurs fois avec de l'alcool, sur un filtre en papier, pour faire disparaître les substances graisseuses solubles qu'il renferme, se dissout de nouveau facilement dans de l'eau physiologique.

Cette substance dissoute dans l'eau physiologique montre une action franchement sa-

traida pelo xilol do bacilo da tuberculoze, quando permanece na estufa a 38º C. durante 24 ou 48 horas. Dêmos a essa substancia a denominação de tuberculo-ciraze.

Uzando tecnica adequada pudemos obter, em virtude dessa saponificação, cristais de palmitina, reunidos em feixes, assim como graxas córaveis pelo *Sudão* e, palidamente, pelo acido osmico.

Procedemos do seguinte modo: Um pouco de tuberculo-ciraze dissolvida em agua fiziolojica, apoz precipitação e lavajem repetida pelo alcool, era posta em contato com um fragmento de cêra de bacilos da tuberculoze, extraida pelo xilol e precipitada pelo alcool absoluto fervente que, mantendo-a dissolvida e em fuzão, devia acarretar as substancias gordurozas soluveis nelle, cazo ellas existissem aí aderentes aos fragmentos de cêra. Como testemunhas empregámos tubos contendo respetivamente cada um, agua fiziolojica e tuberculo-ciraze, agua fiziolojica e cêra.

Depois de permanecerem em contato na estufa a 38º, por 48 horas, foram esses tubos tratados pelo alcool absoluto em excesso e levados á ebulição. Apoz o resfriamento, filtravam-se os licores alcoolicos em filtros para precipitado.

O liquido alcoolico era então tratado por uma solução de soda muito diluida e levada á ebulição.

Deixava-se resfriar; tratava-se depois por uma solução muito diluida de acido sulfurico; fervia-se; deixava-se novamente resfriar. Tratava-se pelo eter.

Apoz a separação das duas camadas, decantava-se a camada eterea sobre um tubo contendo agua distilada. Deixava-se evaporar o eter; quando a evaporação era quazi total, tratava-se pelo *Sudão.*

Examinando em gota pendente encontrava-se, *sómente no tubo* que *continha cêra* e *tuberculo-ciraze* sobre a superficie do liquido globulos de gordura perfeitamente córados, de mistura com grande quantidade de cristais de materia corante. Depozitando uma gota de eter que sobrenadava á agua em uma lamina, antes de fazer ajir a materia corante,

ponifiante sur la cire extraite par le xylol du bacille de la tuberculose, quand il reste dans l'étuve à 38º C., pendant 24 ou 48 heures. Nous avons donné à cette substance le nom de *tuberculo-cirase.*

En employant un procédé convenable, nous avons pu obtenir, grâce à cette saponification, des cristaux de palmitine réunis en faisceaux, ainsi que des corps gras pouvant être colorés par le *Soudan* et, faiblement, par l'acide osmique.

Notre méthode a éte la suivante: Um peu de tuberculo-cirase dissoute dans de l'eau physiologique, après avoir été précipiteé et plusieurs fois laveé par l'alcool, était mise en contact avec um fragment de cire de bacilles de la tuberculose, extraite par le xylol et précipitée par l'alcool absolu. Avant d'être mise en contact avec la tuberculo-cirase, la cire était traitée par l'alcool absolu bouillant qui, la conservant dissoute et en fusion, devait entrainer les substances grasses solubles dans ce vehicule, dans le cas où il y en aurait d'adhérentes aux fragments de cire. Nous nous sommes servi, comme témoins, de tubes contennant, l'un, de l'eau physiologique, et de la tuberculocirase et l'autre, de l'eau physiologique et de la cire. Après être restés pendant 48 heures à l'etuve à 38º, ces tubes ont été traités par l'alcool absolu, en excès, et amenés au point d'ébullition. Après leur refroidissement, on filtrait les liqueurs alcooliques dans des filtres pour précipités.

Le liquide alcoolique était alors traité par une solution de soude très diluée et bouillante. On le laissait refroidir et il était ensuite traité par une solution très diluée d'acide sulfurique; on faisait bouillir et on laissait refroidir de nouveau, puis, on le traitait par de l'éther.

Après la séparation des deux couches, on décantait la couche éthérée sur un tube contenant de l'eau distillée. On laissait évaporer l'éther; quand l'évaporation était presque totale, on traitait par le *Soudan.*

En examinant en goutte suspendue on trouvait, *seulement dans le tube contenant de la cire et de la tuberculo-cirase,* à la surface du liquide, des globules de graisse nettement colorés mélangés avec une grande quantité de

pela evaporação do veiculo, observava-se uma substancia amorfa soluvel no alcool cuja evaporação ocazionava o aparecimento de cristais.

Tomando o licôr alcoolico acima referido, antes de o tratarmos pela soda, e depositando uma gota sobre a lamina, pela evaporação do veiculo, observam-se abundantes cristais morfolojicamente semelhantes á mistura de palmitina e estearina e palhetas aguçadas nas pontas. Para ponto de fuzão desses cristais encontramos 75º C.

A separação dos alcooles constituintes da cêra, obtidos pelo tratamento do licor com o eter, apoz a saponificação pela soda, não nos revelou a existencia de colesterina, izocolesterina e fitosterina, quando sujeitados ás reações respetivas.

Pensamos pois que se tratam de alcooles izomeros com esses.

Concluzões

1.º A acido rezistencia do bacilo da tuberculoze não é devida excluzivamente ás cêras e gorduras existentes no corpo do bacilo.

2.º O bacilo da tuberculoze pode ser diferençado nitidamente dos pseudo-tuberculozos por metodos de coloração especiais que revelam as granulações do interior do bacilo.

3.º Essas granulações têm eletividade para o Gram, em relação ao resto do bacilo.

4.º Essas granulações reprezentam a fórma de maior rezistencia do bacilo.

5.º Nos ganglios tuberculozos cazeificados existe uma substancia capaz de diminuir, *in vitro*, o numero de bacilos da tuberculoze, em dada emulsão.

6.º Essa substancia não é reativada pelo sôro fresco de cobaia nova.

7.º A ação maxima dessa substancia se exerce até 120 horas de contato.

8.º Essa substancia é destruida pelo aquecimento entre 65º e 70º, durante 1 hora.

cristaux de la matière colorante. En déposant sur une lame une goutte de l'éther qui surnageait, avant de faire agir la matière colorante, par l'évaporation du véhicule, on observait une substance amorphe soluble dans l'alcool, et dont l'évaporation donnait lieu à la formation de cristaux.

En prenant la liqueur alcoolique citée cidessus, avant de la traiter par la soude et en déposant une goutte sur la lame, l'évaporation du véhicule nous permet d'observer une grande abondance de cristaux, d'une forme semblable à un mélange de palmitine et stéarine, et de paillettes à deux pointes aigues. Le point de fusion de ces cristaux est de 75º C.

La separation des alcools constitutifs de la cire, obtenus par le traitement de la liqueur avec l'ether, après la saponification par la soude, ne nous a révélé l'existence, ni de cholestérine, ni d'isocholestérine, ni de phytostérine, après avoir été soumis aux réactions nécessaires.

Nous pensons donc qu'il s'agit d'un autre isomère de la cholestérine.

Conclusions

1. La résistance du bacille de la tuberculose aux acides n'est pas due exclusivement aux cires et aux graisses contenues dans le corps du bacille.

2. Le bacille de la tuberculose peut être nettement différencié des pseudo-tuberculeux par des méthodes de coloration spéciale qui révèlent les granulations de l'interieur du bacille.

3. Ces granulations ont de l'électivité pour le Gram par rapport au reste du bacille.

4. Ces granulations représentent la forme de plus grande résistance du bacille.

5. Dans les ganglions tuberculeux caséifiés il existe une substance capable de réduire *in vitro* le nombre des bacilles de la tuberculose, en une émulsion déterminée.

9. Cette substance n'est pas reactivée par l'action du sérum frais de cobaye.

7. L'action *maxima* de cette substance se fait sentir jusqu'à 120 heures de contact.

9.º Essa substancia atúa sobre a cêra do bacilo da tuberculoze, saponificando-a.

10 A saponificação da cêra por essa substancia mostra a existencia de palmitina e estearina, caraterizadas pela morfolojia e ponto de fuzão dos cristais.

11 Essa substancia entra na classe dos enzimas idrolizantes.

8. Cette substance est détruite par le chauffage entre 65 e 70º, pendant 1 heure.

9. Cette substance saponifie la cire du bacille de la tuberculose.

10. La saponification de la cire par cette substance a montré l'éxistence de palmitine et stéarine, caractérisées par la morphologie et le point de fusion des cristaux.

11. Cette substance entre dans la classe des enzymes hydrolysants.

Contribuição para o estudo dos dipteros.

Observações sobre a biolojia e sistematica das anofelinas brazileiras e suas relações com o impaludismo

pelo

Dr. Arthur Neiva,

Assistente do Instituto.

(Estampa 4)

Beitrag zur Kenntniss der Dipteren.

Beobachtungen über die Biologie und Systematik der brasilianischen Anophelinen und deren Beziehungen mit der Malaria

von

Dr. Arthur Neiva,

Assistenten.

(Tafel 4)

Dos 20 generos que constituem a sub-familia *Anophelinæ,* 8 tem reprezentantes no Brazil, sendo que, destes 4 são excluzivamente brazileiros.

Até ha pouco tempo o genero *Pyrethophorus* possuia duas especies brazileiras, deixou, porém, de ser reprezentado na dipterolojia brazilica, com a creação dos generos *Chagasia* e *Myzorhynchella.*

Os generos existentes no Brazil são reprezentados pelas seguintes especies: *Myzomyia lutzi* Theo., *Myzomyia tibiamaculata* Neiva, *Myzomyia gilesi* Neiva, *Cyclolepteron mediopunctatum* Theo.-Lutz, *Cyclolepteron intermedium* Chagas, *Stethomyia nimba* Theo., *Myzorhynchella lutzi* Cruz, *Myzorhynchella parva* Chagas, *Myzorhynchella nigritarsis* Chagas, *Arribalzagaia maculipes* Theo., *Arribalzagaia pseudo-maculipes* Chagas, *Cellia argyrotarsis* Rob. Desv., *Cellia albimana* Wied., *Cellia brasiliensis* Chagas, *Chagasia fajardoi* Lutz, *Manguinhosia lutzi* Cruz.

A especie comum é a *Cellia albimana* que tem sido encontrada em todo o Brazil. O mesmo acontece com a *Cellia argyrotarsis.*

Von den 20 Gattungen, welche die Unterfamilie der Anophelinen bilden, sind 8 in Brasilien vertreten und 4 ausschliesslich brasilianisch.

Bis vor kurzer Zeit besass die Gattung *Pyrethophorus* zwei brasilianische Arten, welche seit der Schöpfung der Gattungen *Chagasia* und *Myzorhynchella* in der brasilianischen Dipterologie nicht mehr erwähnt wurden.

Die in Brasilien vorkommenden Gattungen sind durch folgende vertreten:

Myzomyia lutzi Theob., *Myzomyia tibiamaculata* Neiva, *Myzomyia gilesi* Neiva, *Cyclolepteron mediopunctatum* Theob.-Lutz, *Cyclolepteron intermedium* Chagas, *Stethomyia nimba* Theob., *Myzorhynchella lutzi* Cruz, *Myzorhyuchella parva* Chagas, *Myzorhynchella nigritarsis* Chagas, *Arribalzagaia maculipes* Theob., *Arribalzagaia pseudomaculipes* Chagas, *Cellia argyrotarsis* Rob. Dasv., *Cellia albimana* Wied, *Cellia brasiliensis* Chagas, *Chagasia fajardoi* Lutz, *Manguinhosia lutzi* Cruz.

Die gewöhnlichste Art ist: *Cellia albimana,* welche in ganz Brasilien gefunden wird; dasselbe gilt von *Cellia argrotarsis.*

A *Stethomyia nimba* só tem sido encontrada nos Estados do Pará e no de Minas; neste Estado são encontradas todas as especies de anofelinas brazileiras, com exceção da *Arribalzagaia pseudo-maculipes* e do *Cyclolepteron intermedium.*

As especies *Manguinhosia lutzi, Cellia brasiliensis, Myzorhynchella nigritarsis, Myzomyia tibiamaculata, Myzomyia gilesi,* por emquanto, sómente na rejião mineira têm sido encontradas.

Na cidade do Rio de Janeiro e no Estado do Rio, são encontradas as mesmas especies que ocorrem no Estado de S. Paulo, excetuando a *Chagasia fajardoi,* que, além de Minas, existe em S. Paulo.

Além destas rejiões, as mais conhecidas, pouco se poderá adiantar de seguro, quanto á maioria dos Estados, ainda quazi ignorados ou conhecidos deficientemente, como os do Pará, Bahia, Amazonas e Pernambuco.

Na cidade do Rio de Janeiro, além das duas *Cellicæ* mais vulgarmente conhecidas, ainda existem os *Myzorhynchella lutzi, parva, Myzomyia lutzi, Arribalzagaia maculipes, pseudomaculipes* os *Cyclolepteron mediopunctatum, intermedium.*

O *Cyclolepteron mediopunctatum* é em toda a parte geralmente escasso; já não acontece o mesmo com o *Cyclolepteron intermedium,* que, em certas localidades é muito abundante.

Cada localidade possue sua especie predominante e que é geralmente uma das duas *Cellia albimana* ou *argyrotarsis,* mais commummente a primeira; comtudo logares ha, onde não predominam.

Em Piáu (Juiz de Fóra) Minas, as *Myzorhynchella lutzi* e *parva* são as especies predominantes; em Xérem (Estado do Rio) a *Arribalzagaia pseudo-maculipes* aparece em maior quantidade que a *Cellia albimana,* aliaz muito abundante.

Em Lassance (Minas), a especie predominante é a *Cellia brasiliensis,* entretanto estremamente rara em Juiz de Fóra, rejião bem estudada.

Stethomyia nimba wurde bisher nur in den Staaten Pará und Minas gefunden, in letzterem wurden alle Arten der brasilianischen Anophelinen mit Ausnahme der *Arribalzagaia pseudomaculipes* und des *Cyclolepteron intermedium,* beobachtet.

Die Arten: *Manguinhosia lutzi, Cellia brasiliensis, Myzorhynchella nigritarsis, Myzomyia tibiamaculata* und *Myzomyia gilesi* wurden bis heute nur in der Gegend von Minas gefunden.

In der Stadt Rio de Janeiro und dem Staate desselben Namens findet man dieselben Arten, welche in dem Staate S. Paulo vorkommen, mit Ausnahme der *Chagasia fajardoi,* welche ausser in Minas auch in S. Paulo gesammelt wurde. Diese Gegenden sind am besten bekannt; in Bezug auf die anderen Staaten, wie Pará, Bahia, Amazonas und Pernambuco, die mangelhaft bekannt sind, wird man wenig sicheres sagen können.

In der Stadt Rio de Janeiro gibt es, ausser den zwei *Cellias,* welche am meisten bekannt sind, noch *Myzorhynchella lutzi, parva, Myzomyia lutzi, Arribalzagaia maculipes, pseudomaculipes, Cyclolepteron mediopunctatum* und *intermedium.*

Cyclolepteron mediopunctatum ist überall spärlich, was bei *Cyclolepteron intermedium* nicht der Fall ist; vielmehr ist dieses an bestimmten Orten sehr reichlich vorhanden.

Die meisten Orte besitzen eine vorherrschende Art, welche gewöhnlich eine der zwei *Cellicæ* (*albimana* oder *argyrotarsis*) ist, meistens ist es die erstere; es gibt aber auch Orte, wo keine Art vorherrscht.

In Piau (Juiz de Fóra), Minas sind *Myzorhynchella lutzi* und *parva* die vorherrschenden Arten; im Xerém (Staate Rio) ist die *Arribalzagaia pseudomaculipes* zahlreicher, als die *Cellia albimana,* obgleich letztere sehr häufig vorkommt.

In Lassance (Minas) ist *Cellia brasiliensis* die vorherrschende Art; dagegen ist sie in Juiz de Fóra, einer recht gut erforschten Gegend, ausserordentlich selten.

Die *Chagasia fajardoi,* häufig in Minas (Juiz de Fóra, Barbacena, Oliveira), ist dagegen im Staate S. Paulo sehr spärlich.

A *Chagasia fajardoi,* abundante em Minas (Juiz de Fóra, Barbacena, Oliveira) é escassa nas localidades do Estado de S. Paulo, onde tem sido encontrada.

A *Manguinhosia lutzi,* até agora, só foi encontrada em Bicudos (Minas).

A biolojia das anofelinas brazileiras ainda se encontra muito atrazada; para isto, muito concorre a dificuldade que eziste para se encontrarem as larvas de certas especies.

Apenas de 8 especies de anofelinas são conhecidas as larvas: *Cellia argyrotarsis, Cellia albimana,* larvas muito comuns e prezentes em qualquer depozito d'agua; *Myzohrynchella lutzi* e *parva,* larvas comuns nos pequenos brejos; *Myzomyia lutzi* larva quazi excluzivamente bromelicola.

As larvas de *Chagasia fajardoi* e de *Arribalzagaia pseudo-maculipes* foram creadas artificialmente de posturas obtidas no laboratorio.

Fato extremamente curiozo, é o que se dá em certos logares, onde máo grado a espantoza abundancia de imajens, as pesquizas para a colheita de larvas de determinadas especies são totalmente infrutiferas, apezar de feitas simultaneamente por varias pessoas experimentadas nestes trabalhos, durante horas continuas e em dias sucessivos.

Em Xérem, onde amiudadas vezes pesquizámos larvas, nunca conseguímos capturar uma larva siquer das especies *Cyclolepteron mediopunctatum* e *intermedium* e rarissimas vezes colhémos uma ou outra larva de *Arribalzagaia pseudo-maculipes.*

Ao crepusculo, as anofelinas vêm sucessivamente por especies; esta observação feita pelo Dr. Carlos Chagas, tivemos ocazião de verificar, posteriormente, em diversas localidades.

Em Juiz de Fóra (Piáu), as especies aparecem na seguinte ordem: *Myzorhynchella parva, Myzorhynchella lutzi* e por fim, quazi dentro da noite a *Chagasia fajardoi.*

Em Xérem, em primeiro logar surje a *Arribalzagaia pseudo-maculipes,* mais tarde o *Cyclolepteron intermedium* e, em seguida, o *Cy-*

Die *Manguinhosia lutzi* wurde bis heute nur in Bicudos (Minas) gefunden.

Die Biologie der brasilianischen Anophelinen ist noch wenig erforscht, da es schwierig ist, die Larven von bestimmten Arten zu finden.

Nur von 8 Arten der Anophelinen sind die Larven bekannt, nämlich von *Cellia argyrotarsis, Cellia albimana* (deren Larven sehr gewöhnlich und in jeder beliebigen Wasseransammlung vorhanden sind), *Myzorhynchella lutzi* und *parva.* Letztere sind gewöhnliche Larven in kleinen Sümpfen; *Myzomyia lutzi* findet man beinahe ausschliesslich in Bromeliaceen.

Die Larven der *Chagasia fajardoi* und der *Arribalzagaia pseudomaculipes* wurden aus den, im Laboratorium abgelegten Eiern, künstlich gezüchtet.

Ein äusserst interessanter Fall, welcher an einigen Orten beobachtet wurde, ist der, dass, trotz erstaunlicher Mengen von Mosquitos, die Bemühungen, die Larven von bestimmten Arten zu finden, ganz und gar fruchtlos geblieben sind, obgleich sie gleichzeitig von verschiedenen, in solchen Arbeiten gut bewanderten Forschern Stunden und Tage hindurch gesucht wurden.

In Xerém, wo wir oftmals Larven gesucht haben, ist es uns nie gelungen, eine einzige Larve von den Arten *Cyclolepteron mediopunctatum* und *intermedium* zu finden, und nur sehr selten kamen uns Larven von *Arribalzagaia pseudomaculipes* zu Gesicht.

In der Dämmerung folgen sich die Anophelinen artenweise; diese Beobachtung wurde von Dr. Carlos Chagas gemacht; später hatten wir Gelegenheit, dieselbe an verschiedenen Orten zu bestätigen.

In Juiz de Fóra (Piau) erschienen die Arten in nachstehender Reihenfolge:

Myzorhynchella parva, Myzorhynchella lutzi und zuletzt, beinahe schon am Abend, die *Chagasia fajardoi.*

In Xerém zeigt sich zuerst *Arribalzagaia pseudomaculipes,* später *Cyclolepteron intermedium,* und zuletzt, wenn der Abend schon im Anzuge ist, *Cyclolepteron mediopunctatum.*

Cellia albimana und *C. argyrotarsis* erschei-

dolepteron mediopunctatum, quando a noite já vem caindo.

As *Cellia albimana* e *argyrotarsis* aparecem simultaneamente, logo no principio do crepusculo, permanecendo até o fim.

Vizivelmente ha um otimo de luz que varia para cada especie, de maneira que, conforme o mez, a hora favoravel para o aparecimento e dezaparecimento das anofelinas não é constante.

Nesta rejião observámos que, em Junho, a chegada das anofelinas dava-se ás 5.30 p. m. e a partida ás 6 horas p. m.; dia a dia chegavam mais tarde e, em meiados de Agosto, a hora habitual ocilava entre 5.50 p. m. e 6 horas (chegada) e 6.10 p. m. e 6.20 (partida); raramente se observava entre a chegada da primeira anofelina e o dezaparecimento total, um espaço de tempo que fosse além de 30 e aquém de 15 minutos.

Uma ocazião, porém, 11 de Outubro, as anofelinas começaram a aparecer ás 6.10 p. m. e só se retiraram ás 7.15 p. m., tendo, por conseguinte permanecido durante 65 minutos.

Foi a maior demora que observámos e que tem explicação, no fato da grande claridade não só da noite, como tambem de uma fogueira, cujos reflexos chegavam a iluminar os cavalos sobre os quais colhiamos as anofelinas.

Já tinhamos verificado que nas noites de luar, a permanencia das anofelinas prolongava-se um pouco mais que o habitual.

Em prezença de luz, as anofelinas picam a qualquer hora da noite; muitas vezes, dentro do laboratorio e em horas diferentes da noite, capturámos anofelinas quando sugavam.

Não acreditamos que as anofelinas suguem em completa escuridão, não excetuando a *Chagasia fajardoi* que, de todas é a que fica em prezença de menor quantidade de luz.

Pela madrugada, as anofelinas só aparecem, quando já ha certa claridade e, á medida que esta aumenta, crece o numero daquellas até que, passando um espaço de tempo um pouco maior que o do crepusculo vespertino, retiram-se; durante o crepusculo

nen zugleich beim Beginn der Dämmerung und bleiben bis zuletzt.

Augenscheinlich muss es eine gewisse und bestimmte Lichtmenge geben, welche für jede Art schwankt, weshalb die günstige Stunde zum Erscheinen und Verschwinden der Anophelinen je nach dem Monat keine beständige ist.

In Xerém beobachtete ich, dass im Monat Juni die Anophelinen um 5.30 p.m. erschienen und um 6 Uhr p.m. verschwanden; Tag für Tag erschienen sie später, sodass sie Mitte August gewöhnlich zwischen 5.50 p.m. und 6 Uhr auftraten, um wieder zwischen 6.10 p.m. und 6,20 p.m. zu verschwinden; selten ergab sich zwischen der Ankunft der ersten Anophelinen und dem gänzlichen Verschwinden derselben ein Zeitraum von über 30 Minuten oder unter 15 Minuten.

Ausnahmsweise jedoch erschienen die Anophelinen am 11. October um 6.10 p.m. und verschwanden erst um 7.15 p.m.; sie wurden also während 65 Minuten beständig beobachtet.

Dies war der grösste Zeitraum, den wir feststellen konnten; derselbe war auch leicht zu erklären, da sich mit einer sehr hellen Nacht noch das Licht eines Freudenfestes combinirte, dessen Schein die Pferde, auf denen wir die Anophelinen fingen, beleuchtete.

Wir hatten schon festgestellt, dass in Mondscheinnächten der Aufenthalt der Anophelinen etwas länger dauerte, als gewöhnlich.

Bei Licht stechen die Anophelinen zu irgend einer Stunde der Nacht; sehr oft wurden im Laboratorium Anophelinen des Nachts beim Saugen beobachtet und das zu den verschiedensten Stunden.

Ich bezweifle, dass die Anophelinen in vollständiger Dunkelheit stechen, dies gilt auch für die *Chagasia fajardoi*, welche von allen Anophelinen diejenige ist, die am wenigsten Licht zum Stechen beansprucht.

In der Morgendämmerung erscheinen die Anophelinen, wenn schon eine gewisse Helligkeit vorhanden ist und während diese zunimmt, wächst ihre Anzahl; nachdem ein etwas grösserer Zeitraum, als bei der Abenddämmerung verflossen ist, verschwinden sie wieder; des Morgens erscheinen die Ano-

matutino, as anofelinas aparecem em muito menor numero que no crepusculo vespertino.

Em pleno dia, qualquer especie de anofelina pode ser capturada dentro da mata, todavia, em menor abundancia que aos crepusculos.

Em Piáu (Minas), capturámos diversos exemplares de *Chagasia fajardoi* ás 11 a. m. dentro de uma mata pouco sombria; o Dr. C. Chagas verificou que, em pleno sol, dentro de matas de vejetação rala a *Cellia brasiliensis* ataca fortemente.

Exemplares de *Cellia argyrotarsis* e *albimana*, de *Myzorhynchella lutzi, parva*, de *Arribalzagaia maculipes, pseudo-maculipes*, de *Cyclolepteron intermedium* e *mediopunctatum* já os temos capturado em diferentes horas do dia e em sitios de vejetação pouco densa.

Quanto á influencia dos fatores metereolojicos, pouco podemos informar.

A temperatura de 19º C. não exerce a menor influencia sobre o aparecimento das anofelinas; ainda a 17º C. as anofelinas aparecem com a mesma frequencia habitual e sugam com igual voracidade.

A chuva só tem influencia emquanto cae; uma hora depois de ter cessado de chover, inda que sejam copiozas cargas d'agua de algumas horas de duração, em varias experiencias que realizámos, tivemos a oportunidade de verificar quão abundantes são as anofelinas que facilmente podem ser capturadas, em grande numero.

Quando se vai operar uma mudança de tempo que acarrete chuva, as anofelinas são mais frequentes e vorazes.

Em dias extremamente cálidos, de 39º e mais á sombra, as anofelinas não se resentem do grande calor e picam com voracidade dezuzada.

Estes fatos foram observados quotidianamente durante o espaço de mais de ano e, referem-se ás 8 especies de anofelinas existentes no Xérem.

Para a captura das anofelinas utilizamonos de cavalos, de preferencia aos burros, por serem estes menos perseguidos pelos culíciphelinen in viel kleinerer Anzahl, als in der Abenddämmerung.

Im Walde kann jede Art von Anophelinen am hellen Tage gefangen werden, jedoch in kleinerer Menge, als in der Abenddämmerung.

In Piau (Minas) haben wir in einem wenig schattigen Walde verschiedene Exemplare von *Chagasia fajardoi* gefangen (11 Uhr a.m.). Dr. Chagas beobachtete, dass die *Cellia brasiliensis* in wenig lichten Wäldern selbst bei Sonnenschein lebhaft angreift.

Einzelne Exemplare von *Cellia argyrotarsis* und *albimana, Myzorhynchella lutzi, parva, Arribalzagaia maculipes, pseudomaculipes, Cycloleppteron intermedium*, und *mediopunctatum* wurden von mir schon zu verschiedenen Tageszeiten und an Plätzen mit wenig dichter Vegetation gefangen.

Ueber den Einfluss der Witterung können wir wenig berichten.

Die Temperatur von 19º C. hat nicht den geringsten nachtheiligen Einfluss auf die Zahl der Anophelinen, selbst bei 17º C. erscheinen die Anophelinen in der gewöhnlichen Menge und stechen mit derselben Gier.

Der Regen beeinflusst die Anophelinen nur während des Fallens; eine Stunde nachdem es aufgehört hat zu regnen, (selbst wenn während mehrerer Stunden reichlich Regen gefallen ist) hatte ich mehrmals Gelegenheit zu beobachten, wie häufig die Anophelinen erscheinen und wie leicht sie in Menge gefangen werden können.

Wenn das Wetter sich ändert und Regen droht, sind die Anophelinen häufig und blutdürstig; auch an sehr heissen Tagen, wenn das Thermometer im Schatten 39º C. und mehr aufweisst, stechen sie mit aussergewöhnlicher Gier.

Diese Beobachtungen, die während 14 Monaten täglich gemacht wurden, beziehen sich auf die 8 Arten von Anophelinen, die in Xerém vorkommen.

Um Anophelinen zu fangen, benutzen wir lieber Pferde, als Maultiere, da wir bemerkt haben, dass diese Mücken die Pferde vorzogen; letztere wurden dann in die Nähe der Sümpfe oder Wälder geführt.

das. Os cavalos são conduzidos para as proximidades dos pantanos ou para as matas.

Esta pratica, tem a grande conveniencia de facilitar a captura dos exemplares de culícidas, permitindo que se possam escolher as especies dezejadas.

As anofelinas, em geral, preferem picar o ventre dos animais; as *Myzorhynchella lutzi* e *parva* sugam tambem o pescoço, cabeça e ancas; o *Cyclolepteron mediopunctatum* prefere pouzar sobre as pernas, emquanto que o *Cyclolepteron intermedium* pouza de preferencia no ventre.

Com a utilização de cavalos e com o auxilio de um tubo de Ficalbi e em hora oportuna, capturam-se os culícidas que apareçam.

As anofelinas penetram nos domicilios geralmente, durante o crepusculo vespertino; a invazão matutina opera-se em menor numero.

Procuram picar logo que invadem, mas, devido ao fato, por emquanto inexplicavel, das anofelinas, mesmo as que não tenham sugado, retirarem-se, findo algum tempo, cessam de perseguir e pouzam pelas paredes, de onde levantam vôo á noite para novamente tentarem sugar se, porventura, o compartimento estiver iluminado.

Pela madrugada, as anofelinas que entraram á tarde, sugam avidamente os individuos que ainda se acham adormecidos; depois de repletos, pouzam novamente pelas paredes, onde esperam algumas horas (3 a 4 horas), até que passe o entorpecimento produzido pela repleção, para então abandonarem de vez o domicilio, retirando-se para a mata, de onde voltam á tarde para repetir a refeição.

Das anofelinas creadas em cativeiro, *C. albimana argyrotarsis, A. maculipes, pseudomaculipes, C. mediopunctatum, intermedium, C. fajardoi, M. lutzi, parva,* a maioria alimenta-se diariamente, e algumas fazem mais de uma refeição.

Podem-se tirar destes fatos, concluzões que sirvam para orientação, nas campanhas profilaticas, do serviço de destruição dos mosquitos adultos; que, conforme a nossa observação, deverá ser feito á noite ou logo ao

Dieses Verfahren gestattet nicht nur mit Leichtigkeit zahlreiche Individuen zu fangen, sondern auch eine Auswahl zu treffen.

Die Anophelinen stechen die Tiere mit Vorliebe am Rumpfe; *Myzorhynchella lutzi* und *parva* saugen auch am Halse, am Kopfe und an den Hüften; *Cyclolepteron mediopunctatum* zieht es vor, sich auf die Beine niederzulassen, während *Cyclolepteron intermedium* sich mit Vorliebe auf den Leib setzt.

Unter Benutzung von Pferden und mit Hilfe eines Ficalbischen Fangglases lassen sich zu passender Stunde alle Arten fangen, die am Orte vorkommen.

Die Wohnungen suchen die Anophelinen während der Abenddämmerung auf; während der Morgendämmerung dringen sie in geringeren Mengen ein. Sie suchen sofort nach dem Eindringen zu stechen und verfolgen die einzelnen Individuen während einer gewissen Zeit, welche länger ist, als die, welche wir bei den Pferden in Sümpfen beobachten konnten; diese Thatsache erklärt sich durch das Licht, das in den Wohnungen vorhanden ist. Nach einer gewissen Zeit stellen sie ihre Verfolgung ein und setzen sich an die Wände, ohne gestochen zu haben; nur selten gelingt es, Anophelinen zu fangen, welche sofort gesogen haben. Wenn das Zimmer beleuchtet ist, verlassen sie während der Nacht die Wände und versuchen zu stechen.

Bei Tagesanbruch saugen die Anophelinen, welche am Nachmittag eindringen, mit grosser Gier an Personen, die im Schlafe liegen. Einmal mit Blut gefüllt, setzen sie sich wieder an die Wände und warten einige (3—4) Stunden, während welcher die, nach dem Saugen eingetretene, Torpidität allmählig aufhört. Hierauf fliegen sie aus den Wohnungen ins Freie und kehren des Abends zurück, um die Blutaufnahme zu wiederholen.

In der Gefangenschaft ernähren sich die Anophelinen zum grössten Theil täglich, einige machen selbst mehr als eine Mahlzeit. Diese Beobachtung bezieht sich auf alle in Xerém vorkommenden Arten, mit Ausnahme der daselbst seltenen *Myzomyia lutzi,* und geben die nöthigen Anhaltspunkte, um bei den prophylactischen Massregeln die Vernich-

amanhecer, incontestavelmente as horas mais favoraveis para um espurgo proveitozo.

Quanto á sistematização, as anofelinas brazileiras sofrem da confuzão atualmente reinante neste departamento da dipterolojia.

Nossos estudos, sempre foram orientados pelas normas prescritas por Theobald e, por emquanto, ainda nos utilizamos de sua classificação embora, cada vez mais, reconheçamos quanto é falha.

Entre as ponderações que podemos fazer ao vol. IV da «A Monograph of the Culicidae», ha algumas restrições sobre o genero *Myzorhynchella* que Theo. creou com uma especie brazileira a *Myzorhynchella nigra.*

Por ainda estarmos subordinado a seu criterio sistematico aceitamos o genero, porém contestamos a especie, que não passa do antigo *Anopheles lutzi* — Cruz, 1901.

O carater em que se apoiou Theobald para formar este novo genero, isto é, a auzencia de escamas eretas bifurcadas, na cabeça, é um fato generalizado para todas as anofelinas brazileiras conhecidas, com exceção da *St. nimba* e *Chagasia fajardoi.*

Theobald refere-se ao abdomen da *Myzorhynchella lutzi,* como desprovido de escamas; com certeza o exemplar que lhe ditou esta afirmação, estava avariado, porquanto o segmento genital das *Myzorhynchella lutzi, parva, nigritarsis,* são abundantemente escamozos.

Para aceitarmos o genero tivemos que lhe acrecentar a principal carateristica: *abdomen pilozo, com exceção do segmento genital que é revestido de escamas.*

Aproveitando a oportunidade, vamos identificar a *Myzorhynchella lutzi* Cruz, cuja sinonimia tem sido das mais disparatadas.

Myzorhynchella lutzi — Cruz, 1901.

Anopheles lutzii — Cruz, 1901.

Nyssorhynchus albimanus (sinonimia) Blanchard, 1905.

Myzorhynchella nigra — Theo., 1907.

Das especies brazileiras de anofelinas, são transmissores provados de impaludismo as seguintes: *Cellia albimana* (Indias Ocidentais) *Cellia argyrotarsis* (Brazil) citadas por Stephens e Christophers, 3.ª edição.

tung der erwachsenen Mücken durchzuführen; es folgt daraus, dass dieselbe des Abends oder des Morgens in der Frühe vorgenommen werden sollte, da diese unzweifelhaft den günstigsten Zeitraum darstellen.

Die Classification der brasilianischen Anophelinen leidet zweifellos der Dipterologie in diesem Gebiete unter der gegenwärtig noch herrschenden Verwirrung. Bei derselben folgte ich immer den von Theobald aufgestellten Regeln, dessen Classification ich auch beibehalte, obgleich ich deren Unzulänglichkeit täglich mehr einsehe. Der Haupteinwand, den ich gegen dieselbe, wie sie im vierten Bande seiner Monographie enthalten ist, zu machen habe, bezieht sich auf das Genus Myzorhynchella, welches Theobald auf eine brasilianische, seine *Myzorhynchella nigra,* gründete. Obgleich ich, seiner Classification folgend, das Genus acceptire, muss ich doch die Artbezeichnung beanstanden, da es sich lediglich um die bereits 1901 von Cruz als *Anopheles lutzi* beschriebene Art handelt. Das Kennzeichen, auf welches Theobald die Gründung des neuen Genus basirt, nämlich die Abwesenheit von aufgerichteten und gabelförmigen Schuppen, ist allen brasilianischen Anophelinen gemeinsam, mit alleiniger Ausnahme der *Stethomyia nimba* und der *Chagasia fajardoi.* Theobald bezeichnet das Abdomen seiner Myzorhynchella als frei von Schuppen, jedoch ist wenigstens bei gut erhaltenen Exemplaren bei den *Myzorhynchellaarten lutzi, parva* und *nigritarsis* das Genitalsegment reichlich mit Schuppen bedeckt. Um das Genus anzuerkennen, muss ich als Hauptcharacter anführen: «Abdomen behaart, mit Ausnahme des Genitalsegments, welches mit Schuppen bedeckt ist».

Bei dieser Gelegenheit möchte ich noch die Synomyie der M. *lutzi* citiren; dieselbe ist eine äusserst confuse, nämlich:

(*M. lutzi Cruz*) *Anopheles Lutzii Cruz* 1901, *Pyrethophorus Lutzi Bourroul* 1904, *Nyssorhynchus albimanus* cx parte Blanchard (irrtümlich als Synonym angeführt) 1905, *Myzorhynchella nigra.*

Ich gehe nun auf die Rolle über, welche die einzelnen Anophelinenarten bei der Uebertragung der Malaria spielen:

As pesquizas feitas entre nós deram o seguinte rezultado: transmitem terçã maligna as *Cellia argyrotarsis* (Gomes de Faria, Ruy Ladislao) *Cellia albimana* (Ruy Ladislao) *Arribalzagaia pseudo-maculipes* (Ruy Ladislao, Neiva) *Cyclolepteron intermedium* (Ruy Ladislao, Neiva); terçã benigna as *Cellia albimana* (Chagas, Ruy Ladislao) *Cellia argyrotarsis* (Ruy Ladislao).

Estas verificações foram feitas do seguinte modo:

As anofelinas eram alimentadas em impaludados gametoforos que, em varios e minudentes exames de sangue revelavam serem parazitados por uma só especie de plasmodio.

Posteriormente, pesquizavam-se os quistos nesses mosquitos.

Kennord verificou na Guiana Ingleza a transmissão do impaludismo pelo *Cyclolepteron mediopunctatum,* nada adiantando sobre a especie do plasmodio transmitido por esta anofelina.

Quanto á transmissão pela *Myzomyia lutzi,* todos os fatos levam a crêr que seja uma especie perigoza, comtudo, falta ainda uma verificação exata; o ooquisto achado por Galli-Valerio numa *Myzomyia lutzi* conservada em alcool e remetida do Paraná, apenas aumenta a probabilidade desta anofelina transmitir impaludismo, porquanto, não ha quem possa diferenciar em um estomago de anofelina, principalmente conservado da maneira citada o plasmodio humano do plasmodio aviario.

Quanto á prezença de ooquinetos, referida por Stephen e Christophers, para a *M. lutzi* é uma observação que facilmente pode ser feita em qualquer anofelina, alimentada em gametoforos em condições de transmissibilidade; desta verificação não se deve concluir que o ooquineto possa sempre evoluir até esporozoito.

Especies bem suspeitas são as *Cellia brasiliensis Myzorhynchella lutzi* e *parva;* a *Stethomyia nimba* é, por ora, incriminada, por Low, de transmitir impaludismo na Guiana.

Stephens und Christophers (Practical study of Malaria, London 1908) führen als Malariaüberträger *Cellia albimana* aus Westindien und *Cellia argyrotarsis* aus Brasilien an; auf welche Autoritäten sie sich dabei stützen, ist uns zur Zeit unbekannt. Auf experimentellem Wege wurden hier zu Lande als Zwischenwirth festgestellt, für Tertiana maligna: *Cellia argyrotarsis* (Gomes de Faria, Ruy Ladislao), *Cellia albimana* (Ruy Ladislao), *Arribalzagaia pseudomaculipes* (Ruy Ladislao, Neiva), *Cyclolepptеron intermedium* (Ruy Ladislao, Neiva), für Tertiana benigna: *Cellia albimana* (Chagas, Ruy Ladislao), *Cellia argyrotarsis* (Ruy Ladislao). Die Untersuchungen wurden auf folgende Weise vorgenommen: Die Anophelinen wurden mit dem Blute von Individuen ernährt, welche, wie durch wiederholte Untersuchungen festgestellt wurde, nur eine Art von Plasmodien und diese im Gametenzustand beherbergten. Später wurden dann in diesen Mücken die Oocysten aufgesucht. In British Guyana stellte Kennord die Transmission der Malaria durch *Cyclolepptеron mediopunctatum* fest, ohne einen Aufschluss über die Plasmodiumart, welche übertragen wurde, zu geben.

Was die Uebertragung durch die *Myzomyia lutzi* anbetrifft, so deutet alles darauf hin, dass diese Art gefährlich ist, jedoch fehlt ein genauer Beweis dafür, denn die von Galli-Valerio bei in Alcohol aufbewahrten Mücken gefundenen Cysten, die von Paraná geschickt worden waren, können kaum als beweisend angesehen werden, da eine Unterscheidung zwischen vom Menschen oder von Vögeln abstammenden Haematozoen unter diesen Umständen kaum möglich sein dürfte.

Was die von Stephens und Christophers angeführte Beobachtung von Ookineten im Magen anbetrifft, so kann dieselbe leicht bei jeder Art von Anophelinen gemacht werden, wenn dieselben mit Blut von Gametenträgern genährt werden, ohne dass man daraus schliessen dürfte, dass der Ookinet sich auch zum Sporozoiten entwickeln würde.

Sehr verdächtig sind auch *Myzorhynchella Lutzi* und *parva; Stethomyia nimba* wird von Low der Uebertragung der Malaria in Guyana angeschuldigt.

Lith.Hartmann Reichenbach S.Paulo

No mapa apenso (Est. 4) damos a distribuição, por Estados, das anofelinas brazileiras; as lacunas ainda são imensas, entretanto, utilizamo-nos para a sua confeção de todas as informações colhidas por nós diretamente, ou por autores e observadores dignos de todo o credito.

Alguns mezes depois de prontas as notas precedentes, em Janeiro do corrente ano, tivemos a oportunidade de verificar nos campos de Avanhandava, no noroeste de São Paulo, a maneira de se comportar da *Cellia brasiliensis* que, em pleno dia, ao sol, num campo dezabrigado, ataca aos enxames, homens e animais; o mesmo acontecendo em dias chuvozos, quando, imediatamente apoz cessação da chuva ou até ainda chuviscando fracamente, aflue em verdadeiros enxames bem carateristicos desta especie que, neste particular em nada se parece com numerozos outros culícidas que já temos tido ocazião de estudar em identicas condições, não excetuando o *Taeniorhynchus albicosta* e os *Myzorhynchella parva* e *lutzi* que, embora afluam abundantemente, não enxameam como acontece com a *Cellia brasiliensis*.

Esta especie pouza sobre qualquer parte do corpo do cavalo, sem ter logar de preferencia como observámos e referimos para algumas outras anofelinas; neste ponto a *C. brasiliensis* procede do mesmo modo que as *C. argyrotarsis* e *albimana*.

Provavelmente é uma especie transmissora do impaludismo e, o que nos leva a esta supozição, é a prezença de impaludismo em localidades como Avanhandava, onde esta especie existe em abundancia extraordinaria, quazi que escluzivamente.

Tambem verificámos a existencia da *Manguinhosia lutzi* no noroeste de S. Paulo, junto ás marjens do rio Tieté; esta especie, até então, só tinha sido encontrada em Minas e, em ambas rejiões, sempre em companhia da *C. brasiliensis*.

Auf der beigefügten Karte ersieht man die Verbreitung der Anophelinen in den verschiedenen brasilianischen Staaten; die Lücken sind noch immer sehr gross, obgleich wir bei ihrer Anfertigung alle von uns direct gemachten oder zuverlässigen Beobachtern entnommenen Angaben verwendet haben.

Einige Monate nach Vollendung der vorangehenden Beobachtungen, im Januar dieses Jahres, hatten wir Gelegenheit, auf den Campos von Avanhandava, im Nordwesten von S. Paulo, die Gewohnheiten der *Cellia brasiliensis* zu verfolgen, welche am hellen Tage, bei Sonnenschein und auf offenem Felde Menschen und Tiere angreift. Auch an regnerischen Tagen geschah dasselbe, indem unmittelbar nach Aufhören des Regens oder bei noch schwachem Fortdauern desselben, diese Art in förmlichen Schwärmen auftrat, welche für dieselbe characteristisch sind. Dadurch unterscheidet sie sich vollkommen von den zahlreichen Mückenarten, die wir unter ähnlichen Bedingungen studiren konnten, nicht ausgenommen *Taenierhynchus albicosta, Myzorhynchella parva* und *M. Lutzi,* welche, obwohl zahlreich auftretend, doch nicht derartige Schwärme bilden. Unsere Art lässt sich, auf irgend einem Teile des Körpers der Pferde nieder, ohne eine bestimmte Stelle zu bevorzugen, wie wir diess bei anderen Anophelinen beobachtet und angeführt haben. Sie verfährt hierin ebenso, wie die *Cellia argyrotarsis* und *albimana*.

Diese Art ist wohl zweifellos im Stande, Malaria zu übertragen, wie wir aus dem häufigen Vorhandensein derselben an Orten, wie Avanhandava, schliessen, wo sie in ausserordentlicher Menge und nahezu ausschliesslich vorkommt.

Ausserdem hatten wir auch Gelegenheit, das Auftreten der *Manguinhosia Lutzi* an den Ufern des Tietés im Nordwesten von S. Paulo zu constatiren; diese Art war früher nur in Minas gefunden worden. In beiden Regionen kam sie immer in Gesellschaft der *Cellia brasiliensis* vor.

TOMO I FACICULO II

MEMORIAS

DO

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RIO DE JANEIRO — MANGUINHOS

AGOSTO DE 1909

(Publicado em Dezembro)

SUMARIO:

Pag.

I — Dr. S. von PROWAZEK — **Contribuição para o estudo do dezenvolvimento do "Spirochaeta gallinarum"** (7 figuras no texto) 79

II — Dr. ALCIDES GODOY — **Multiplicação dos bacterios em cultura.** I. Constante de velocidade de multiplicação 81

III — Dr. GOMES DE FARIA — **Echinostomum crotophagae, n. sp.** Novo parazito do anú azul, Crotophaga maior. L. (Estampa 5). 99

IV — Dr. S. von PROWAZEK — **Duplicidade morfolojica nos infuzorios ciliados** (Estampa 6) 105

V — Dr. ARTHUR MOSES — **Da pesquiza de antijeno e de anticorpo pela fixação de complemento** . . 109

VI — Dr. ADOLPHO LUTZ — **Contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Simulium"**. 124

VII Drs. S. von PROWAZEK e H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Estudos sobre a variola** (2 figuras no texto e estampas 7 e 8). 147

VIII Dr. CARLOS CHAGAS — **Nova tripanozomiaze humana.** Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem (10 figuras no texto e estampas 9—13) 159

SOMMAIRE:

I — Dr. S. von PROWAZEK — **Zur Entwicklung von "Spirochaeta gallinarum"** (7 Text-Figuren) . . 79

II — Dr. ALCIDES GODOY — **Ueber die Vermehrung der Bacterien in den Culturen.** I. Die Constante ihrer Geschwindigkeit 81

III — Dr. GOMES DE FARIA — **Echinostomum crotophagae, n. sp.** A new parasite of the blue anú, Crotophaga maior. L. (With plate 5) 99

IV — Dr. S. von PROWAZEK — **Formodimorphismus bei ciliaten Infusorien** (Tafel 6) 105

V — Dr. ARTHUR MOSES — **Ueber den Nachweis von Antigen und Antikörper durch Komplementablenkung** 109

VI — Dr. ADOLPHO LUTZ — **Beitrag zur Kenntniss der brasilianischen Simuliumarten.** 124

VII — Drs. S. von PROWAZEK und H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Variola-Untersuchungen.** (2 Text-Figuren und Tafel 7 und 8). 147

VIII — Dr. CARLOS CHAGAS — **Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen.** Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, Erreger einer neuen Krankheit des Menschen (10 Text-Figuren und Tafel 9—13) 159

AVIZO As «MEMORIAS» serão publicadas em faciculos, que não aparecerão em datas fixas e que formarão volumes de mais ou menos 200 pajinas. No minimo, aparecerá um volume por ano.

Na parte escrita em portuguez foi adotada a grafia aconselhada pela Academia de Letras do Rio de Janeiro.

Toda correspondencia relativa ás «MEMORIAS» deverá ser dirijida ao **"Diretor do Instituto Oswaldo Cruz - Caixa postal 926 - Manguinhos - Rio de Janeiro".**

AVIS Les «MEMOIRES» seront publiés par fascicules qui ne paraitront pas en epoques determinées et qui formeront des volumes d'à peu près 200 pages. Il paraitra chaque année, au moins, un volume.

La partie portugaise est écrite selon la graphie adoptée par l'Académie de Lettres de Rio de Janeiro.

Toute correspondance doit être adressée au **"Directeur de l'Institut Oswaldo Cruz — Caisse postale 926 - Manguinhos - Rio de Janeiro".**

Contribuição para o estudo do dezenvolvimento do "Spirochaeta Gallinarum"

pelo

Dr. S. von Prowazek.

(Com 7 figuras no texto)

Zur Entwicklung von "Spirochaeta Gallinarum"

von

Dr. S. von Prowazek.

(Mit 7 Abbildungen im Text)

Durante minha permanencia, por muitos mezes, em Manguinhos pesquizei, quazi que diariamente, de Outubro de 1908 a Janeiro de 1909 carrapatos *(Argas miniatus Koch)* infetados com o *Spirochæta gallinarum,* em preparados coloridos pelo processo de *Loeffler* e pude verificar o seguinte:

As mais das vezes no fim do 3.º dia, apoz a infeção aparecem os primeiros *spirochaetæ* no lacunoma do carrapato; para isto verificar basta incizar cuidadozamente com tezoura fina uma das pernas do argas e, assim, seguramente se encontram no liquido turvo, rico de leucócitos, da cavidade geral, espiroquetas cujo numero aumenta mais tarde.

No lacunoma tem lugar uma *evolução* da qual poderão ser observados os seguintes estádios:

1.º Espiroquetas que se acham apostos aos leucócitos e, em parte, tambem, alguns no interior delles.

2.º *Estádios de multiplicação* dos espiroquetas (Fig. 1, no 3.º dia; Fig. 2, no 7.º dia; Fig. 3, no 28.º dia, etc.). Na Fig. 1, vè-se ainda entre as duas metades fendidas do corpo do espiroqueta, o periplasto distendido sob a fórma de membrana. Mais tarde, os espiroquetas tornam-se muito delgados e com espiras estreitas (Fig. 5). O estádio de multiplicação figurado no dezenho 5 e que

Während meines mehrmonatlichen Aufenthaltes in Manguinhos untersuchte ich vom Oktober bis Januar 1909 fast täglich nach *Löffler* gefärbte Ausstriche von mit *Spirochaeta gallinarum* infizierten Zecken (*Argas miniatus Koch*) und konnte folgendes feststellen:

Zumeist am 3. Tage nach der Infektion treten die ersten Spirochaeten im Lakunom der Zecke auf; man braucht nur vorsichtig ein Bein der Zecke mit einer kleinen Scheere anzuschneiden und ist sicher, in der trüben leukocytenhaltigen Leibeshöhlenflüssigkeit bereits Spirochaeten zu finden, deren Zahl später zunimmt.

Im Lakunom findet eine *Entwicklung* statt und man kann folgende Stadien beobachten:

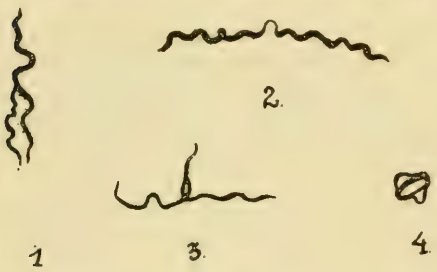
1) Spirochaeten, die den Leukocyten anliegen, zum Teil kann man sie auch im Innern der Leukocytenzellen nachweisen.

2) *Vermehrungszustände* der Spirochaeten. (Fig. 1 am 3. Tage, Fig. 2 am 7. Tage, Fig. 3 am 28. Tage etc.). In Fig. 1 sieht man zwischen den beiden Spalthälften des Spirochaetenleibes noch den hautartig ausgezogenen Peripalast. In der Folgezeit werden die Spirochaeten sehr *zart* und *enggewunden* (Fig. 5). Das Vermehrungsstadium der Fig. 5, das aus dem Lakunom der Zecke 48 Tage nach der Infektion stammt, kann man als *mul-*

provém do lacunoma dum argas, com 48 dias de infeção, póde ser interpretado como um estádio de *repetidas* divizões lonjitudinais, no qual os individuos orijinados dessa divizão sucessiva se desdobram como os decimetros dum desses metros articulados uzados pelos carpinteiros.

3.º Na cavidade do corpo, encontram-se, tambem, fórmas enroladas de espiroquetas (Fig. 4).

Examinando as glandulas salivares izoladas verifiquei a existencia dos primeiros espiroquetas no fim de 14 dias. Aí se acham tambem no estádio de divizão lonjitudinal (Fig. 6 — 21 dias). No intestino; os espiroquetas aglomeram-se muito cedo, morrendo



provavelmente a maioria delles. Aí encontram-se mais tarde fórmas empalidecidas, ou filamentos que *aprezentam intumecencias* do corpo celular, emquanto que o periplasto ainda é vizivel, sob a fórma de fio delgado e ondulozo. (Fig. 7).

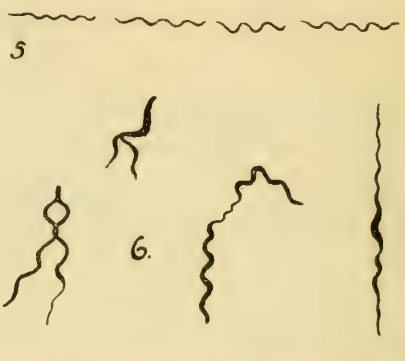
Nos ovos dos argas não foram encontrados espiroquetas. Destas pesquizas rezulta que o *Spirochæta gallinarum* efetua um ciclo evolutivo (multiplicação, divizão multipla, fórmas delgadas, estádio de repouzo) que se processa em certo espaço de tempo e que, em consequencia disto, é encontrado no lacunoma intato (mais ou menos depois do 3.º dia) e nas glandulas salivares (mais ou menos no 14.º dia).

O carrapato é efetivamente o *hospedeiro intermediario* do *Spirochæta* e não simples transmissor passivo, como ultimamente, por varios, tem sido considerado.

tiples Längsteilungsstadium auffassen, indem sukzessive die einzelnen Teilindividuen sich auseinanderlegten wie die Dezimeterteile eines zusammenlegbaren Zimmermannmetermasses.

3) Kommen in der Leibeshöhle auch *eingerollte* Spirochaetenformen vor Fig. 4).

In der herauspräparierten Speicheldrüse wurden von mir die ersten Spirochaeten nach 14 Tagen gefunden. Es kommen hier auch Längsteilungsstadien vor (Fig. 6, 21 Tage). Im Darm agglomerieren die Spirochaeten frühzeitig und die Hauptmasse geht wohl zu Grunde.



Man findet hier später abgeblasste Formen oder Spirochaetenfäden, deren Zellleib lokal *Anschwellungen besitzt*, während der Periplast als ein zarter, gewellter Faden noch vorhanden ist. (Fig. 7).

In den Eiern wurden keine Spirochaeten gefunden. Aus den Untersuchungen geht hervor, dass *Spirochaeta gallinarum* in der Zecke eine über einen gewissen Zeitraum ausgedehnte Entwicklung (Vermehrung, multiple Teilung, zarte Formen, Ruhestadien) durchmacht und dass man demgemäss die Spirochaeten im unverletzten Lakunom (ca. nach 3 Tagen) und in der Speicheldrüse (ca. nach 14 Tagen) findet.

Die Zecke ist der *tatsächliche Zwischenwirt* der *Spirochaeta* und nicht etwa ein passiver Ueberträger, wie in der letzten Zeit von mehreren Seiten angenommen wird.

Multiplicação dos bacterios em cultura.

I. Constante de velocidade de multiplicação

pelo

Dr. Alcides Godoy,

Assistente do Instituto.

Ueber die Vermehrung der Bacterien in den Culturen.

I. Die Constante ihrer Geschwindigkeit

von

Dr. Alcides Godoy,

Assistenten des Instituts.

Sobre a relação existente entre o numero de bacterios e o tempo de vejetação num meio de cultura não são muitos os trabalhos experimentais.

NAEGELI, por meio de uma formula deduzia da quantidade de acido formado, em tempos conhecidos, por um bacterio zimojenico, a quantidade total de elementos que havia no liquido em fermentação; este metodo de avaliação é assaz interessante, especialmente por ser um processo indireto de pesquiza, para o julgamento dos rezultados obtidos por processo direto.

BUCHNER, LONGARD e RIEDLIN, partindo da idéa aprioristica que, sendo a segmentação dos bacterios a divizão transversal, rezultando 2 unidades de cada celula preexistente, conclue d'aí que conhecido o numero de bacterios semeados (a), e os existentes no fim de certo tempo (b), se poderia determinar o numero de gerações (n) pela formula

$$n = \frac{\log. b - \log. a}{\log. 2}$$

conhecido o valor de *n*, o tempo necessario para a completa faze da vejetação a partir da divizão que orijinou a nova celula, até aquelle

Die experimentellen Arbeiten über die Beziehungen zwischen der Anzahl der Bacterien und ihrer Vegetationszeit in einem Kulturmedium sind keineswegs zahlreich. NAEGELI berechnete mit Hilfe einer Formel aus den, von einem Gährungsbacterium in bekannten Zeiträumen gebildeten, Säuremengen die Totalanzahl der in der Gährungsflüssigkeit vorhandenen Individuen; diese Schätzungsmethode ist, gerade weil es sich um eine indirecte Untersuchungsmethode handelt, von bedeutendem Interesse für die Beurteilung der durch einen directen Prozess gewonnenen Resultate.

BUCHNER, LONGARD und RIEDLIN gingen von der aprioristischen Idee aus, dass die Teilung der Bacterien eine transversale ist und aus jeder ursprünglichen Zelle zwei Einheiten hervorgehen und schlossen daraus, dass, wenn die Anzahl der eingesäten Bacterien (a) und diejenige der nach einer bestimmten Zeit vorhandenen gegeben ist, man die Anzahl der Generationen aus folgender Formel bestimmen könne.

$$n = \frac{\text{Log. b} - \text{Log. a}}{\text{Log. 2}}$$

em que esta por sua vez, se desdobra, seria o quociente do numero de minutos decorridos na experiencia pelo numero *n* de gerações formadas. Os autores não provam a exatidão da formula pela avaliação do numero de microbios em tempos diversos; só fazem duas determinações, a da quantidade semeada e a correspondente a certo tempo de vejetação. Julgam os autores que, sendo o tempo de duração da experiencia apenas de algumas horas a influencia da diminuição de alimentos não se fará sentir na velocidade da multiplicação.

Este modo de considerar a multiplicação dos bacterios é demaziado elementar e simples, contrario ás leis de formação na natureza. Já RAULIN, em 1867, havia demonstrado que existe uma relação numerica constante entre o pezo do vejetal formado e o da substancia nutritiva dezaparecida do meio de cultura.

Funcionalmente podemos considerar as celulas, como porções limitadas de uma substancia — substancia de natureza quimica ainda desconhecida — possuindo a propriedade de aumentar de massa, desde que se lhe forneçam: os compostos quimicos necessarios a essa sinteze, a energia preciza e condições favoraveis de meio. Seria a substancia viva, como que uma especie de catalizador capaz de aumentar a massa pela sua propria ação.

Na cultura dos microbios a equação da *vida elementar manifestada*

$$a + q = \lambda a + R$$

deverá encontrar a sua mais clara aplicação. Como se sabe, nesta equação, *a* reprezenta a substancia viva, *q* os alimentos, λ um coeficiente maior que a unidade, e R os reziduos da assimilação.

Rezulta disto que a quantidade de substancia *a* formada é função de *q*, cazo o coeficiente λ não venha ainda por seu valor ser novo elemento para o calculo. No cazo especial dos bacterios e nos meios de cultura de compozição não completamente determinada, a avaliação direta de *q* é impossivel,

Wenn der Wert von n bekannt ist, so wäre die Zeit für die ganze Vegetationsphase, vom Momente der Teilung, welche die neue Zelle lieferte, bis zu dem, in welchem diese sich wiederum teilt, gleich dem Quotienten aus der Anzahl der verflossenen Minuten und der Zahl *n* der gebildeten Generationen. Die Autoren geben keinen Beweis der Richtigkeit ihrer Formel durch Schätzung der Keimzahl zu verschiedenen Zeiten, sondern machen nur zwei Bestimmungen, diejenige der eingesäten Menge und eine solche, die einer bestimmten Vegetationszeit entspricht. Sie sind der Ansicht, dass, bei einer Versuchsdauer von nur einigen Stunden, der Einfluss der Verminderung der Nährstoffe auf die Vermehrungsgeschwindigkeit nicht bemerkbar werde.

Diese Auffassungsweise der Bacterienvermehrung ist allzu elementar und im Widerspruch zu den Bildungsgesetzen in der Natur. Schon RAULIN hat 1867 nachgewiesen, dass zwischen dem Gewichte des gebildeten Pflanzengewebes und der aus dem Nährmedium verschwundenen Nährsubstanz ein constantes Zahlenverhältniss besteht.

Functionell können die Zellen als begrenzte Teile einer — ihrer chemischen Natur nach unbekannten — Substanz aufgefasst werden, welche die Fähigkeit besitzen, an Masse zuzunehmen, sobald ihnen die zu dieser Synthese nötigen chemischen Verbindungen, die notwendige Energie und günstige Bedingungen des Mediums geboten werden. Es stellt somit die lebende Substanz eine Art Katalysator dar, der im Stande ist, seine Masse durch seine eigene Tätigkeit zu vermehren.

Bei der Kultur der Microben sollte die Gleichung der *elementaren Lebensäusserung*

$$a + q = \lambda a + R$$

ihre deutlichste Anwendung finden. Wie bekannt, bedeutet a die lebende Substanz, q die Nährstoffe, λ einen Coefficienten, der grösser ist, als die Einheit und R die Residuen der Assimilation.

Es folgt daraus, dass die gebildete Quantität der Substanz a eine Function von q ist, falls nicht der Coefficient λ durch seinen Wert ein neues Element in der Rechnung bildet.

porem a quantidade de *a* póde ser determinada pelo numero de unidades formadas. As quantidades de bacterios formados e de alimentos existentes são inversas, isto é essencial ao modo de interpretar a experiencia que segue e as concluzões que della decorrem.

Procurámos indicar com precizão as condições de experiencia. Evitámos as cauzas capazes de obscurecer o fenomeno, regularizando as necessarias e eliminando as nocivas. As medidas de volume, assim como as de temperatura comportam exatidão superior a 1 % e, na avaliação final das colonias de cada observação o erro não excede 4 %.

Interpretados os rezultados desta experiencia, de acordo com o modo de ação das massas quimicas, segundo a lei de GULDBERG e WAAGE, torna-se claro que a transformação dos alimentos, num meio nutritivo, em substancia viva — e, por conseguinte a formação de nóvas celulas — se faz pelo processo geral das ações quimicas. E', pois, calculavel em limites de tempo em que o coeficiente λ pelo seu valor não altera completamente a marcha da reação, pela formula das reações monomoleculares:

$$\frac{-dt}{-dx} = C\,k$$

O valor de *k*, constante de velocidade de reação é determinado com tal aproximação que põe fóra de duvida a aplicabilidade da formula.

Para verificarmos experimentalmente a concepção expendida procurámos estudar a multiplicação do bacilo tifico em um caldo de carne peptonizado a 1 %, para o que adotámos a seguinte tecnica.

Tecnica. — A cerca de 10 c. c. de caldo adicionámos, de uma cultura de 12 horas, em caldo da mesma fabricação, a quantidade necessaria para se obter uma lijeira turvação; lijeira, porem bem nitida. Desta primeira diluição adicionámos 0,05 c. c. a segundo tubo com egual quantidade do mesmo caldo; da diluição assim preparada retirámos 0,05 c. c. para terceiro tubo. Naturalmente, ajitavamos cuidadozamente a mistura de modo a se dar repartição unifórme dos germens

Im speciellen Falle der Bacterien und in Nährmedien von nicht genau definirter Zusammensetzung, ist die directe Schätzung von q unmöglich, dagegen kann die Quantität *a* aus der Zahl der gebildeten Einheiten bestimmt werden. Die Zahl der gebildeten Bacterien und die Menge der vorhandenen Nährstoffe verhalten sich umgekehrt, was für die Erklärung des nachstehenden Versuches und der daraus folgenden Schlüsse wesentlich ist.

Ich habe versucht, die Bedingungen des Versuches klar anzugeben und die Ursachen zu vermeiden, welche die Beobachtung zu trüben im Stande wären, indem ich die notwendigen Bedingungen regelte und die hinderlichen vermied. Die Messungen des Volumens und der Temperatur gestatten eine Genauigkeit, die mehr als ein Procent beträgt und bei der schliesslichen Schätzung der Colonien in jeder Beobachtung gehen die Irrtümer nicht über 4 % hinaus. Deutet man die Resultate dieses Versuches in Uebereinstimmung mit der Wirkungsweise der chemischen Massen nach dem Gesetz von GULDBERG und WAAGE, so geht deutlich daraus hervor, dass in einem Culturmedium die Umwandlung der Nährstoffe in lebende Substanz und dem entsprechend auch die Bildung neuer Zellen nach dem allgemeinen Process der chemischen Vorgänge stattfindet. Sie lässt sich also innerhalb von Zeitgrenzen, zwischen welchen der Coefficient durch seinen Wert den Ablauf des Vorganges nicht gänzlich verändert, aus der Formel der monomoleculären Reactionen

$$\frac{-dt}{-dx} = C\,k$$

berechnen. Der Wert von k, der Constanten der Geschwindigkeit der Reaction, lässt sich mit einer derartigen Annäherung bestimmen, das die Anwendbarkeit der Formel nicht zu bezweifeln ist.

Um die auseinandergesetzte Auffassung experimentell zu controlliren, versuchte ich, die Vermehrung des Typhusbacillus in Nährbouillon mit 1 % Pepton zu studiren, wobei ich mich folgender Technik bediente:

Technik. Zu ca. 10 c. c. Nährbouillon wurden von einer zwölfstündigen, in Bouillon

no caldo. Da ultima diluição assim obtida, retirámos com pipeta normal, 1,00 c. c. que colocavamos em tantos tubos quantas as observações que pretendiamos fazer. Os tubos de ensaio que empregámos eram de vidro rezistente de Ehrhardt e Metzger de Darmstadt, (R-Glas), e submetidos a ação do vapor d'agua como indica ABEGG, e em seguida, depois de esgotados e secos eram fechados com rolha de borracha esterilizada pela ebulição e seca. Os tubos eram, então, levados a um termostato modelo OSTWALD, previamente regulado para a temperatura maxima provavel do dia da experiencia, 27,0 gráos centigrados; a agua era mantida em contante ajitação por meio de turbina. A temperatura da agua ocilava em limites de 0,05 de gráo. A temperatura do exterior era, na ocazião da colocação dos tubos no termostato, de 26º, e pouco decreceu no decurso dos 105 minutos que durou a experiencia. Os tubos, apezar disto, permaneceram sempre no termostato e somente ficaram á temperatura do laboratorio o tempo estritamente necessario para nelles se colocar o agar e derramal-o em placas. Depois de feita a I observação — tempo 0 — analoga ás adiante descritas, retiravamos, de 15 em 15 minutos, um tubo ao qual adicionavamos 10 c. c. de agar fundido e esfriado a 44º. O tubo era ajitado 5 vezes por movimento de bascula, para egual repartição dos microbios; o agar era então derramado em placas de Petri. Com cada tubo faziamos 2 placas: a 1.ª, na qual havia uma camada de agar que se gelificára, estando a placa imovel, de modo a formar superficie horizontal, recebia o agar semeado. Esta 1.ª placa recebia a quazi totalidade dos germens. No tubo com o qual se tinha preparado a 1.ª placa derramava-se nova porção de agar fundido e esfriado a 44º, destinado a acarretar os microbios existentes na porção restante de agar aderente as paredes do tubo. Com esta nova porção de agar preparava-se a 2.ª placa pelo processo habitual.

As placas assim feitas apoz completa gelificação — cerca de 10 minutos — eram levadas para estufa regulada a 37º. No in-

derselben Herstelluug gemachten, Kultur soviel zugesetzt, als nöthig war, um eine leichte, aber deutliche, Trübung zu erzielen. Von dieser ersten Verdünnung wurden 0,05 cc. einem Tubus zugesetzt, der eine gleiche Quantität der gleichen Nährflüssigkeit enthielt; von der so hergestellten Verdünnung entnahm ich 0,05 cc. für einen dritten Tubus. Natürlich wurden die Mischungen sorgfältig geschüttelt, um eine gleichmässige Verteilung der Keime in der Bouillon zu erzielen. Von der letzten so hergestellten Verdünnung entnahm ich mit einer Normalpipette je 1 cc. für so viele Tuben, als ich zu den Beobachtungen gebrauchte. Die verwendeten Reagenzgläschen waren aus R.-Glas von EHRHARDT und METZGER in Darmstadt und wurden nach der Angabe von ABEGG mit Wasserdampf behandelt und nach dem Trocknen mit einem, durch Auskochen sterilisirten, trockenen Gummipfropfe verschlossen. Die Röhrchen wurden hierauf in einen Thermostaten von OSTWALD gebracht, der zuvor für die wahrscheinliche Maximaltemperatur des Versuchstages, 27° Centigrade, regulirt war, wobei das Wasser durch eine Turbine in beständiger Bewegung erhalten wurde. Die Wärme des Wassers schwankte innerhalb einer Grenze von 0,05 Graden, während die Aussentemperatur 26° betrug, als die Röhrchen in den Thermostaten gebracht wurden und während der 105 Minuten, welche der Versuch dauerte, nur wenig abnahm. Uebrigens blieben die Tuben doch immer im Thermostaten und wurden der Laboratoriumstemperatur nur so lange ausgesetzt, als für den Zusatz von Agar und das Giessen von Platten unbedingt nötig war. Nachdem die erste Beobachtung (Zeit = Null) nach Art der unten beschriebenen gemacht war, entnahm ich von 15 zu 15 Minuten ein Röhrchen, dem ich 10 cc. geschmolzenen und auf 44° abgekühlten Agars zusetzte. Dasselbe wurde fünf mal durch Schaukelbewegung geschüttelt, um eine gleichmässige Verteilung der Microbien zu erzielen und der Agar darauf in Petrischalen ausgegossen. Mit jedem Tubus machte ich zwei Platten; die erste enthielt eine Agarschicht, welche ohne Bewegung der Platte erstarrt war, sodass sie eine horizontale Oberfläche darbot

terior desta o ar não era artificialmente humidecido, o que, favorecendo a dessecação do meio nutritivo evitava um crecimento exajerado e a confluencia das colonias superficiais. As placas ficavam na estufa, cobertas apenas com o papel de filtro que tinha sido colocado na face interna da tampa, antes da esterilização.

Depois de 24 horas de estufa eram as placas d'aí retiradas e contadas as colonias. A contajem se fazia em aparelho por nos idéado e que oferece a vantajem da vizão simultanea, em mesmo plano das colonias e das divizões de escala semelhante a de BUERKER, para contajem de globulos sanguineos, porem 21,5 vezes maior. Sob cada placa traçavamos dois diametros perpendiculares, limitando, assim, os quadrantes, e contavamos em cada quadrante a superficie de 4,622 cm.^{2} — 4 series horizontais de quadrados formam um quadrado grande, correspondente á superficie acima indicada. — Depois, contavamos sobre as linhas limitadoras outras tantas unidades de superficie. Obtinhamos assim 8 series de contajens. Cada serie é, na experiencia, reprezentada pela soma de 4 parcelas formadas pelo numero de colonias contidas nas series horizontais de pequenos quadrados. Nossa unidade de superficie é $^1/_9$ da escala de BUERKER aumentada 21,5 vezes.

Todas as colonias dezenvolvidas na 2.ª placa eram contadas diretamente, sem recorrer ao aparelho, marcando-se o lugar de cada colonia com um ponto de tinta, o que póde sempre ser feito visto como, nessa placa, o numero de colonias é sempre pequeno. Contadas as 8 series da 1.ª placa, somam-se os seus valores para determinação do valor medio da serie. Determina-se a diferença que cada serie faz com esse valor medio; somam-se estas diferenças depois de elevadas ao quadrado. Dividindo-se o numero obtido por 56, a sua raiz quadrada dá o erro provavel para cada serie; isto, segundo a conhecida formula

$$F = \pm \sqrt{\Sigma d^2/n\,(n-1)}$$

und wurde mit dem besäten Agar beschickt; sie enthielt nahezu die gesamte Menge der Keime. In das Röhrchen, welches zur Herstellung der ersten Platte gedient hatte, wurde eine neue Portion geschmolzenen und auf 44° abgekühlten Agars eingegossen, um die — in der noch zurückgebliebenen, den Wänden des Tubus anhaftenden, Agarmenge vorhandenen — Keime herauszuspülen; mit dieser neuen Agarportion wurde die zweite Platte auf gewöhnliche Weise angefertigt. Die so hergestellten Platten wurden nach vollständiger Gerinnung, d. h. nach ca. 10 Minuten, in einen auf 37° regulirten Brütschrank gebracht; die Luft im Innern des Letzteren war nicht künstlich feucht gemacht, sodass durch Begünstigung der Austrocknung des Nährbodens ein übertriebenes Wachstum und ein Zusammenfliessen der oberflächlichen Colonien vermieden wurde. Die Platten blieben im Brütschrank nur mit dem Filtrirpapier bedeckt, welches vor der Sterilisirung in die Innenseite des Deckels eingelegt worden war.

Nach 24 Stunden wurden die Platten aus dem Brütschranke entnommen und die Colonien gezählt. Die Zählung geschah mit Hilfe eines von mir ersonnenen Apparates, welcher den Vorzug bietet, dass man gleichzeitig in einer Ebene die Colonien und die Abteilungen einer Scala erblickt. Letztere gleicht derjenigen von BÜRKER für die Zählung der Blutkörperchen, jedoch 21,5 mal grösser. Auf jeder Platte zeichnete ich zwei senkrechte Diameter und zählte auf jedem der so entstandenen Quadranten die Oberfläche von 4,622 Quadratcentimeter, was einem grossen, aus 4 horizontalen Serien kleiner Quadrate gebildeten, Vierecke entspricht. Dann zählte ich auf den Begrenzungslinien ebensoviele Oberflächeneinheiten und erhielt so acht Zählungsreihen. Jede Serie ist in dem Versuche durch die Summe von vier Zahlen vertreten, welche jeweilen der Anzahl der, in den Horizontalreihen von kleinen Quadraten enthaltenen, Colonien entsprechen. Meine Oberflächeneinheit ist gleich einer 21,5-fachen Vergrösserung des neunten Teiles einer Bürkerschen Scala.

Alle in der zweiten Platte entwickelten Colonien wurden direct gezählt, indem der

Determinado assim o valor medio de cada serie e seu erro medio provavel, são elles multiplicados pelo quociente da area da placa, pela superficie contada, em cada serie. Este produto reprezenta o numero total de colonias da 1.ª placa e seu erro medio provavel. Adicionado á esse valor o numero de colonias encontradas na segunda placa, tinhamos o numero total de microbios existentes em cada tubo, na ocazião de se fazer nelle a adição de agar.

Fizemos as 8 observações seguintes:

Ort jeder Colonie durch einen Tintenpunkt markirt wurde, was vollständig genügt, da die Anzahl der Colonien auf dieser Platte immer eine geringe ist. Nachdem die acht Serien der ersten Platten gezählt sind, summirt man die Beträge, um den Mittelwert der Serie zu bestimmen. Für jede Serie bestimmt man den Unterschied von disem Mittelwerte und summirt diese Differenzen, nachdem man sie ins Quadrat erhoben hat. Wenn man die Summe durch 56 dividirt, so ergiebt ihre Quadratwurzel den wahrscheinlichen Durchschnittsirrtum für jede Serie nach der bekannten Formel:

$$F = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n\,(n-1)}}$$

Wenn so für jede Serie der Durchschnittswert und der wahrscheinliche Durchschnittsfehler bestimmt ist, wird er in jeder Serie mit den Quotienten aus der Oberfläche der Platte und der gezählten Oberfläche multiplicirt; das Product ergibt die Gesamtzahl der Colonien der ersten Platte und den wahrscheinlichen Durchschnittsfehler. Durch Addition dieses Wertes zu der Gesamtzahl der auf der zweiten Platte gefundenen Colonien erhielt ich die Gesamtzahl der Keime, welche in jedem Röhrchen vorhanden waren, als ihm der Agar zugesetzt wurde.

Ich machte die acht folgenden Beobachtungen:

I Observação

(0 minutos)

Area da 1.ª placa = 63,61 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
23	32	29	36	26	34	36	25
25	44	29	26	26	34	28	29
29	22	39	29	28	31	24	23
25	25	27	28	33	36	23	27
102	123	124	119	113	135	111	104

Series	Somas	d	d^2
1	102	14	196
2	123	7	49
3	124	8	64
4	119	3	9
5	113	3	9
6	135	19	361
7	111	5	25
8	104	12	144
	931		857

$$\text{Media das series} = \frac{931}{8} = 116$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{857}{56}} = \pm 4$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$116 \pm 4 \,.\, 13{,}76 = 1596 \pm 56$$

1.ª placa = ... 1596 ± 56
2.ª » = ... 47
Total I e erro medio = . 1643 ± 56

Beobachtung I

(0 Minuten)

Flächeninhalt der Platte = 63,61 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
23	32	29	36	26	34	36	25
25	44	29	26	26	34	28	29
29	22	39	29	28	31	24	23
25	25	27	28	33	36	23	27
102	123	124	119	113	135	111	104

Serien	Summen	d	d^2
1	102	14	196
2	123	7	49
3	124	8	64
4	119	3	9
5	113	3	9
6	135	19	361
7	111	5	25
8	104	12	144
	931		957

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{931}{8} = 116$$

$$\text{Durchschnittsfehler} = \pm\sqrt{\frac{857}{56}} = \pm 4$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$116 \pm 4 \,.\, 13{,}76 = 1596 \pm 56$$

Erste Platte = ... 1596 ± 56
Zweite Platte = ... 47
Total von I und Durchschnittsfehler = . . . 1643 ± 56

II Observação

(15 minutos)

Area da 1.ª placa = 66,47 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4.622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
35	37	34	24	28	31	28	29
25	36	32	25	26	41	29	23
32	25	25	36	19	22	28	37
29	31	25	32	30	26	27	31
121	129	116	117	103	120	112	120

Series	Somas	d	d²
1	121	4	16
2	129	12	144
3	116	1	1
4	117	0	0
5	103	14	196
6	120	3	9
7	112	5	25
8	120	3	9
	938		400

$$\text{Media das series} = \frac{938}{8} = 117$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{400}{56}} = \pm 3$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$117 \pm 3 \,.\, 14{,}38 = 1682 \pm 43$$

1.ª placa = ...	1682 ± 43
2.ª placa = ...	41
Total II e erro medio = .	1723 ± 43

Beobachtung II

(15 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 66,47 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
35	37	34	24	28	31	28	29
25	36	32	25	26	41	29	23
32	25	25	36	19	22	28	37
29	31	25	32	30	26	27	31
121	129	116	117	103	120	113	120

Serien	Summen	d	d²
1	121	4	16
2	129	12	144
3	116	1	1
4	117	10	190
5	103	14	196
6	120	3	9
7	112	5	25
8	120	3	9
	938		400

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{933}{8} = 117$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= \pm\sqrt{\frac{400}{56}} = \pm 3$$

Total und Durchschnittsfehler Zweite Platte

$$117 \pm 3 \,.\, 14{,}38 = 1632 \pm 43$$

Erste Platte = ...	1682 ± 43
Zweite Platte = ...	41
Total von II und Durchschnittsfehler = . . .	1723 ± 43

III Observação

(30 minutos)

Area da 1.ª placa = 59,44 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
33	30	32	40	26	44	39	27
22	35	42	41	26	38	40	33
34	28	26	43	33	37	31	32
39	44	32	37	33	39	30	40
128	137	132	151	118	158	140	152

Series	Somas	d	d²
1	128	11	121
2	137	2	4
3	132	7	49
4	151	12	144
5	118	21	441
6	158	19	261
7	140	1	1
8	152	13	169
	1116		1290

$$\text{Media das series} = \frac{1116}{8} = 139$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{1296}{56}} = \pm 5$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$139 \pm 5 \,.\, 12{,}86 = 1787 \pm 64$$

1.ª placa = ... 1787 ± 64
2.ª placa = ... 83
Total III e erro medio = . 1870 ± 64

Beobachtung III

(30 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 59,44 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
33	30	32	40	26	44	39	27
22	35	42	41	26	38	40	33
34	28	26	40	33	37	31	32
39	44	32	37	33	39	30	40
128	137	132	151	118	158	140	152

Serien	Summen	d	d²
1	128	11	121
2	137	2	4
3	132	7	49
4	151	12	144
5	118	21	441
6	158	39	361
7	140	1	1
8	152	13	169
	1116		1290

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1116}{8} = 139$$

$$\text{Durchschnittsfehler des Mittels} = \pm\sqrt{\frac{1396}{56}} = \pm 5$$

Total und Durchschnittsfehler Dritte Platte

$$139 \pm 5 \,.\, 12{,}86 = 1787 \pm 64$$

Erste Platte = ... 1787 ± 64
Zweite Platte = ... 83
Total von III und Durchschnittsfehler . . . . 1870 ± 64

IV Observação

(45 minutos)

Area da 1.ª placa = 62,21 cm.².
Superficie contade em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
28	25	40	37	38	41	35	46
33	33	26	31	29	40	38	37
30	37	36	37	41	35	32	39
42	34	39	36	35	32	22	40
133	129	141	141	143	148	127	162

Series	Somas	d	d^2
1	133	7	49
2	129	11	121
3	141	1	1
4	141	1	1
5	143	3	9
6	148	8	64
7	127	13	169
8	162	22	484
	1124		898

$$\text{Media das series} = \frac{1124}{8} = 140$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{898}{56}} = \pm 4$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$140 \pm 4 \,.\, 13{,}46 = 1884 \pm 54$$

1.ª placa = ...	1884 ± 54
2.ª placa = ...	87
Total IV e erro medio = .	1971 ± 54

Beobachtung IV

(45 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 62,21 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
28	25	40	37	38	41	35	46
33	33	26	31	29	40	38	37
30	37	36	37	41	35	32	39
42	34	39	36	35	32	22	40
133	129	141	141	143	148	127	162

Serien	Summen	d	d^2
1	133	7	49
2	129	11	121
3	141	1	1
4	141	1	1
5	143	3	9
6	148	8	64
7	127	13	169
8	162	22	484
	1124		898

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1124}{8} = 140$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= \pm\sqrt{\frac{898}{56}} = \pm 4$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$140 \pm 4 \,.\, 13{,}46 = 1884 \pm 54$$

Erste Platte = ...	1884 ± 54
Zweite Platte = ...	87
Total von IV und Durchschnittsfehler	1971 ± 54

V Observação

(60 minutos)

Area da 1.ª placa = 63,6 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
32	33	33	46	27	38	40	40
31	28	37	36	29	40	30	45
36	35	38	32	34	38	39	26
36	42	41	32	30	37	42	34
135	138	149	146	120	153	151	145

Series	Somas	d	d^2
1	135	7	49
2	138	4	16
3	149	7	49
4	146	4	16
5	120	22	484
6	153	11	121
7	151	9	81
8	145	3	9
	1137		825

$$\text{Media das series} = \frac{1137}{8} = 142$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{825}{56}} = \pm 4$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$142 \pm 4 \,.\, 13{,}76 = 1954 \pm 55$$

1.ª placa = ... 1954 ± 55
2.ª placa = ... 92
Total V e erro medio = . 2036 ± 55

Beobachtung V

(60 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 63,61 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
32	33	33	46	27	18	40	40
31	28	37	36	29	40	30	45
36	35	38	32	34	38	39	26
36	42	41	32	30	37	42	34
135	138	149	146	120	153	151	145

Serien	Summen	d	d^2
1	135	7	49
2	138	4	16
3	149	7	49
4	146	4	16
5	120	22	484
6	153	11	121
7	151	9	81
8	145	3	9
	1137		825

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1137}{8} = 142$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= \pm\sqrt{\frac{825}{56}} = \pm 4$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$142 \pm 4 \,.\, 13{,}76 = 1954 \pm 55$$

Erste Platte = ... 1954 ± 55
Zweite Platte = ... 82
Total von V und Durchschnittsfehler = . . . 2036 ± 55

VI Observação

(75 minutos)

Area da 1.ª placa = 65,03 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
40	30	39	30	51	34	38	23
42	37	33	36	36	40	33	43
33	42	31	30	34	36	41	27
28	32	35	30	36	39	48	40
143	141	138	136	157	149	150	133

Series	Somas	d	d²
1	143	0	0
2	141	2	4
3	138	5	25
4	136	7	49
5	157	14	196
6	149	6	36
7	150	7	49
8	133	10	100
	1147		459

$$\text{Media das series} = \frac{1147}{8} = 143$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{459}{56}} = \pm 3$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$143 \pm 3 \,.\, 14{,}07 = 2011 \pm 42$$

1.ª placa = ...	2011 ± 42
2.ª placa = ...	90
Total VI e erro medio = .	2101 ± 42

Beobachtung VI

(75 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 65,03 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
40	30	39	30	51	34	38	23
42	37	33	36	36	40	33	43
33	42	31	30	34	36	31	27
28	32	35	30	36	39	48	40
143	141	138	136	157	149	150	133

Serien	Summen	d	d²
1	143	0	0
2	241	2	4
3	138	5	25
4	136	7	49
5	157	14	196
6	149	6	16
7	150	7	49
8	133	10	100
	1147		459

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1147}{8} = 143$$

$$\text{Durchschnittsfehler des Mittels} = \pm\sqrt{\frac{459}{56}} = +3$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$143 \pm 3 \,.\, 14{,}07 = 2011 \pm 42$$

Erste Platte = ...	2011 ± 42
Zweite Platte = ...	90
Total von VI und Durchschnittsfehler = . . .	2101 ± 42

VII Observação

(90 minutos)

Area da 1.ª placa = 66,47 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
33	29	42	37	35	33	35	39
34	39	38	49	33	42	46	40
28	53	39	30	38	43	42	36
38	33	22	47	29	38	34	38
133	154	141	173	135	156	157	153

Series	Semas	d	d²
1	133	17	289
2	154	4	16
3	141	9	81
4	173	23	529
5	135	15	225
6	156	6	36
7	157	7	49
8	153	3	9
	1202		1234

$$\text{Media das series} = \frac{1202}{8} = 150$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{1234}{56}} = \pm 22$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$150 \pm 22 \,.\, 14{,}38 = 2157 \pm 316$$

1.ª placa = ... 2157 ± 316
2.ª placa = ... 98
Total VII e erro medio = . 2255 ± 316

Beobachtung VII

(90 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 66,47 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
33	29	42	37	35	33	35	39
34	39	38	49	33	42	46	40
28	53	39	30	38	43	42	36
38	33	22	47	29	38	34	38
133	154	141	173	135	156	157	153

Serien	Summen	d	d²
1	133	17	289
2	154	4	16
3	141	9	81
4	173	23	529
5	135	15	225
6	156	6	36
7	157	7	49
8	153	3	9
	1202		1234

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1202}{8} = 150$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= \pm\sqrt{\frac{1234}{56}} = \pm 22$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$150 \pm 22 \,.\, 14{,}38 = 2157 \pm 316$$

Erste Platte = ... 2157 ± 316
Zweite Platte 98
Total von VII und Durchschnittsfehler = . . . 2255 ± 316

VIII Observação

(105 minutos)

Area da 1.ª placa = 63,61 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
39	35	43	35	39	35	22	41
45	33	34	41	39	46	44	38
38	42	51	33	41	40	41	43
33	47	39	40	36	40	41	37
155	157	167	149	155	161	148	159

Series	Somas	d	d^2
1	155	1	1
2	157	1	1
3	167	11	121
4	149	7	49
5	155	1	1
6	161	5	25
7	148	8	64
8	159	3	9
	1251		271

$$\text{Media das series} = \frac{1251}{8} = 156$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{271}{56}} = \pm 2$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$156 \pm 2 \,.\, 13{,}76 = 2147 \pm 27$$

1.ª placa = ... 2147 ± 27
2.ª placa = ... 78
Total VIII e erro medio = 2225 ± 27

Beobachtung VIII

(105 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 63,61 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
39	35	43	35	39	35	22	41
45	33	34	41	39	46	44	38
38	42	51	33	41	40	41	43
33	47	39	40	36	40	41	37
155	157	167	149	155	161	148	159

Serien	Summen	d	d^2
1	155	1	1
2	157	1	1
3	167	11	121
4	149	7	49
5	155	1	1
6	161	5	25
7	148	8	64
8	159	3	9
	1251		271

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1251}{8} = 156$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= \pm\sqrt{\frac{271}{56}} = \pm 2$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$156 \pm 2 \,.\, 13{,}76 = 2147 \pm 27$$

Erste Platte = ... 2147 ± 27
Zweite Platte = ... 78
Total von VIII und Durchschnittsfehler = . . . 2225 ± 27

São estes os numeros totais de colonias e seu erro medio em cada observação, e, como é mais correto e traz simplificação ao calculo escrevemos sómente os 3 primeiros algarismos, separando por um ponto a caza dos milhares:

Observação	Total de colonias e erro provavel
I	1.64 ± 0.05
II	1.72 ± 0.04
III	1.87 ± 0.06
IV	1.97 ± 0.05
V	2.03 ± 0.05
VI	2.10 ± 0.04
VII	2.25 ± 0.316
VIII	2.22 ± 0.02

Dos valores acima podemos deduzir o numero de microbios formados durante as fazes da experiencia. A variação para mais ou para menos dos valores de cada observação, rezultante do erro de contajem, faz com que tenhamos, para cada observação, dois valores um maximo e um minimo:

Observação	max.	min.
I	1.69	1.59
II	1.76	1.68
III	1.93	1.81
IV	2.02	1.92
V	2.08	1.98
VI	2.14	2.06
VII	2.56	1.94
VIII	2.24	2.20

A quantidade de microbios será reprezentada pelo valor maximo, quando d'um valor maximo subtrairmos um minimo, ou por um valor minimo quando de um minimo subtrairmos um maximo.

Os numeros, rezultantes da subtração dos valores maximo ou minimo da observação VIII de um valor minimo ou maximo de uma outra observação, dão respetivamente o numero maximo ou minimo de bacterios, formados no tempo correspondente ao numero de minutos obtidos pela subtração do numero de 105, — tempo total da experiencia de minutos decorridos do inicio da experiencia, até a observação que se estuda. São

Dies sind die Totalzahlen der Colonien und ihr Durchschnittsfehler in jeder Beobachtung; da es richtiger ist und die Berechnungen vereinfacht, schreibe ich nur die drei ersten Zahlen, indem ich die Tausende durch einen Punkt abtrenne:

Beobachtung	Totalzahl der Colonien und wahrscheinlicher Fehler
I	1.64 ± 0,05
II	1.72 ± 0,05
III	1.87 ± 0.06
IV	1.97 ± 0,05
V	2.03 ± 0,05
VI	2.10 ± 0,04
VII	2.25 ± 0,31
VIII	2.22 ± 0.02

Von den obigen Werten kann man die Zahl der während der Versuchsphasen gebildeten Keime abziehen. Das Schwanken der Versuchsfehler nach plus und minus macht, dass wir für jedes Experiment einen Maximal- und einen Minimalwert haben:

Beobachtung	Max.	Min.
I	1.69	1.79
II	1.66	1.58
III	1.93	1.81
IV	2.02	1.92
V	2.08	1.98
VI	2.14	2.06
VII	2.56	1.94
VIII	2.24	2.20

Die Anzahl der Keime wird durch einen Maximalwert repräsentirt, wenn wir von einem Maximalwert ein Minimum oder durch einen Minimalwert, wenn wir einem Minimum ein Maximum subtrahiren.

Die Zahlen, welche aus der Subtraction der Minimal- und Maximalwerte einer anderen Beobachtung von den Maximal- und Minimalwerten der Beobachtung VIII erhalten werden, geben jeweilen die Maximal- und Minimalzahlen der im gegebenen Zeitraum gebildeten Bacterien; derselbe entspricht der Anzahl der Minuten, welche man durch Subtraction der Zahl von Minuten, welche seit Beginn des Versuches bis zu der betreffenden Beobachtung vergingen, von 105, der gesamten Ver-

estes os valores maximos e minimos correspondentes a cada espaço de tempo:

minutos	max.	min.
105	0.65	0.51
90	0.56	0.44
75	0.43	0.27
60	0.32	0.18
45	0.26	0.12
30	0.18	0.06
15	0.30	—

Vejamos a media entre os valores maximos e minimos de cada tempo:

minutos	media
105	0.58
90	0.50
75	0.36
60	0.25
45	0.19
30	0.12

A diferença entre 0.58 e 0.50 corresponde á quantidade de microbios formados nos 15 primeiros minutos; entre 0.58 e 0.35 nos 30 primeiros, etc., assim:

minutos	quantidade
0	0.58
15	0.50
30	0.35
45	0.25
60	0.19
75	0.12

Apliquemos aos valores acima a formula

$$k = \frac{\log. C_0 - \log. C}{\delta},$$

que é a integração de $-dt/-dx = C\,k$, e calculemos a constante k:

minutos	valores	log. C_0 — log. C	0.4343 k
0	0.58	—	—
15	0.50	0.06446	0.0430
30	0.35	0.21836	0.0728
45	0.25	0.36549	0.0812
60	0.19	0.48468	0.0808
75	0.12	0.68425	0.0912

valor medio de $0.4343\ k = 0.0738$

suchszeit, erhält. Es sind dies die Maximal- und Minimalwerte, die jedem Zeitraum entsprechen:

Minuten	Max.	Min.
105	0.65	0.51
90	0.56	0.43
75	0.43	0.27
60	0.32	0.18
45	0.26	0.12
30	0.18	0.06
15	0.04	—

Hier sind die Mittel aus den Maximal- und Minimalwerten jedes Zeitraums:

Minuten	Mittel
105	0.58
90	0.50
75	0.36
60	0.25
45	0.19
30	0.12

Der Unterschied zwischen 0.58 und 0.50 entspricht den in den 15 ersten Minuten gebildeten Keimen; der zwischen 0.58 und 0.35 den in den ersten 30 Minuten etc., also:

Minuten	Anzahl
0	0.58
15	0.50
30	0.35
45	0.25
60	0.19
75	0.12

Wenden wir die obigen Werte auf die Formel

$$k = \frac{\text{Log. } C_0 - \text{Log. } C}{\delta}$$

an, welche die Integrale von $-dt/-dx = Ck$ ist und berechnen wir die Constante k:

Minuten	Werte	Log. C_0 — Log. C	0.4343 k
0	0.58	—	—
15	0.50	0.06446	0.0430
10	0.35	0.21836	0.0728
45	0.25	0.36549	0.0812
60	0.19	0.48468	0.0808
75	0.12	0.68425	0.0912

Mittelwert von $0.4343\ k = 0.0738$

0.0738 microbios seria pois o numero formado por 1.64 em cada minuto, si se retirassem os novos microbios formados, á medida de sua formação, se neutralizassem as substancias nocivas existentes e se adicionassem as gastas pela vejetação.

Conhecido assim a constante de multiplicação do bacilo tifico, em caldo á temperatura de 27.0 C. vejamos qual a concordancia entre os valores encontrados nas nossas observações e os calculados com o auxilio dessa constante:

0.4343 k	minutos	log. C_0 — log. C	valores
0.0738	0	—	0.58
—	15	0.1107	0.45
—	30	0.2214	0.35
—	45	0.3321	0.37
—	60	0.4428	0.21
—	75	0.5535	0.16
—	90	0.6642	0.12
—	105	0.7749	0.10

Damos agora no seguinte quadro, á coluna 1.ª, o numero de microbios da observação VIII e na 2.ª coluna o numero de microbios formados durante as diferentes fazes da experiencia. Subtraído dos valores da 1.ª coluna os seus correspondentes da 2.ª, obtemos os da 3.ª que, como já dissemos anteriormente, reprezentará para cada observação, o numero de colonias que se deveram encontrar, cazo a concordancia entre os numeros de colonias observadas e as calculadas com o auxilio da formula das reações monomoleculares fosse completo:

2.22 — 0.50 = 1.64
— — 0.45 = 1.77
— — 0.35 = 1.87
— — 0.27 = 1.95
— — 0.21 = 2.01
— — 0.16 = 2.06
— — 0.12 = 2.10
— — 0.10 = 2.12

Ainda nas tres colunas seguintes se encontram: na 1ª os valores medios de cada observação, na 2ª os calculados, na 3ª os mesmos valores aumentados ou diminuidos nos limites de seu erro medio provavel, com o fim

0.0738 wäre also die Anzahl der von 1.64 in jeder Minute gebildeten Keime, wenn man die neu gebildeten, in dem Maase, wie sie entstehen, entfernen würde, unter Neutralisirung der vorhandenen schädlichen Substanzen und Ersetzung der beim Wachstum verbrauchten.

Wenn demgemäss die Constante der Vermehrung des Typhusbacillus in Nährbouillon bei 27,0° bekannt ist, vergleichen wir die in unseren Beobachtungen gefundenen Werte mit den mit Hilfe dieser Constanten berechneten:

0.434 k	Minuten	Log. C_0 — Log. C	Werte
0.0738	0	—	0.58
0.0738	15	0.1107	0.45
0.0738	30	0.2214	0.35
0.0738	45	0.3321	0.37
0.0738	60	0.4428	0.21
0.0738	75	0.5535	0.16
0.0738	90	0.6642	0.12
0.0738	105	0.7749	0.10

Wir geben nun in der folgenden Tafel in der ersten Columne die Anzahl der Keime der Beobachtung VIII und in der zweiten diejenige der in den Versuchsphasen gebildeten:

2.22 — 0.50 = 1.64
2.22 — 0.45 = 1.77
2.22 — 0.35 = 1.87
2.22 — 0.27 = 1.95
2.22 — 0.21 = 2.01
2.22 — 0.16 = 2.06
2.22 — 0.12 = 2.10
2.22 — 0.10 = 2.12

In der nachfolgenden Tabelle findet man in der ersten Columne die Mittelwerte jeder Beobachtung, in der zweiten die berechneten und in der dritten dieselben, aber innerhalb der Grenzen der wahrscheinlichen Versuchsfehler vermehrt und vermindert, um die innerhalb der Fehlergrenzen bestehende Uebereinstimmung zwischen den berechneten und beobachteten Werten zu zeigen:

de mostrar a concordancia dentro desses limites, entre os valores calculados e observados:

observação	valores obs.	valores calc.	valores obs. e cor.
I	1.64	1.64	1.64
II	1.72	1.77	1.77
III	1.87	1.88	1.88
IV	1.97	1.95	1.95
V	2.03	2.01	2.01
VI	2.10	2.06	2.06
VII	2.25	2.10	2.25
VIII	2.22	2.12	2.20

A concordancia é completa nas 6 primeiras observações; a V porem, está já provavelmente em dezacordo, pois foi necessario o maior afastamento permitido para que a concordancia fosse completa entre o valor da 2ª e 3ª colunas. Na VIII o afastamento é bastante grande. Esta discordancia deve ser atribuida á formação de novos microbios, dotados, como os primeiros, da faculdade de reprodução, capazes de compensarem, por esta razão, o decrecimento das substancias nutritivas, no meio de cultura.

Devemos, pois, á serie de analojias que RAULIN indicou, entre a formação dos vejetais e a dos compostos não organizados acrecentar a seguinte:

A formação de certos vejetais microscopicos se faz segundo a mesma lei que reje a dos compostos não organizados (Lei de GULDBERG-WAAGE).

Beobachtung	Beob. Werte	Berechn. Werte	Beob. und corr. Werte
I	1.64	1.64	1.64
II	1.72	1.77	1.77
III	1.87	1.88	1.88
IV	1.97	1.95	1.95
V	2.03	2.01	2.01
VI	2.10	2.06	2.06
VII	2.25	2.10	2.25
VIII	2.22	2.12	2.20

In den ersten 6 Beobachtungen ist die Uebereinstimmung eine vollständige; die fünfte jedoch stimmt wahrscheinlich bereits nicht mehr überein, da die grösste Abweichung nötig war, um die völlige Uebereinstimmung zwischen den Werten der zweiten und dritten Columne herbeizuführen. In Beobachtung VII und VIII ist die Abweichung ziemlich gross. Dieselbe muss der Bildung neuer Keime zugeschrieben werden, welche, wie die ersten, reproductionsfähig sind und deshalb die Abnahme der Nährsubstanzen in dem Culturmedium compensiren können.

Wir müssen daher der Reihe von Analogien, welche RAULIN zwischen der Bildung pflanzlicher Zellen und derjenigen unorganischer Verbindungen angegeben hat, die Folgende hinzufügen:

Die Bildung gewisser mikroscopischer Pflanzen geht nach demselben Gesetze vor sich, welches die nicht organisierten Körper regiert (Gesetz von GULDBERG-WAAGE).

Echinostomum crotophagae, n. sp.

Novo parazito do anú azul. Crotophaga maior. L.

pelo

Dr. Gomes de Faria.

(Estampa 5)

Echinostomum crotophagae, n. sp.

A new parasite of the blue anú, Crotophaga maior, L.

by

Dr. Gomes de Faria.

(With plate 5)

Material:

O material que serviu para a descrição desta especie foi em parte colecionado por nós, em diversos exemplares de *Crotophaga maior*, caçados nas marjens dos Rios Tieté e Paraná e tambem em 2 exemplares trazidos do Estado do Pará pelo Dr. A. Lutz.

Habitat:

Vive no intestino delgado do anú azul, — *Crotophaga maior L.*

Caracteres externos:

Dimensões: O comprimento varia entre 3 mm e 8 mm e a largura maxima entre 1 mm e 1,9 mm. Os exemplares estudados têm as seguintes dimensões:

	Largura maxima	Comprimento
1. exemplar	1,2 mm	6 mm
2. »	1,5 mm	7 mm
3. »	1,6 mm	6 mm
4. »	1,5 mm	6,5 mm
5. »	1,0 mm	3 mm
6. »	1,9 mm	8 mm

Côr:

Quando vivos, são de côr branca acinzentada.

Movimentos:

Logo que são tirados do animal e examinados em agua fiziolojica mostram vivos mo-

Source of Material:

This species has ben described from several specimens collected by the author while hunting on the margins of the rivers Tieté and Paraná and from two other specimens brought by Dr. Lutz from the state of Pará.

Habitat:

Small intestine of the *Crotophaga maior L.*

External caracters:

Size: The parasites vary from 3 mm to 8 mm in length, and from 1 mm to 1,9 mm in maximum breadth. Six specimens gave the following measurements in millimeters:

	maximum breadth	length
1st specimen	1,2 mm	6 mm
2nd »	1,5 mm	7 mm
3rd »	1,6 mm	6 mm
4th »	1.5 mm	6,5 mm
5th »	1,0 mm	3 mm
6th »	1,9 mm	8 mm

Colour:

Greyish white, when living.

Movements of the worm:

The living worm when taken from the animal and placed in salt solution showed

vimentos de alongamento e retração do corpo, assim como tambem tendem a enrolar-se.

Fórma:

O corpo é fuziforme, a extremidade anterior, afilada e a posterior tambem afilada termina em saliencia obtuza. Entre a ventoza bucal e ventral o corpo sofre um achatamento, o que o torna mais delgado.

Superficie:

Na face dorsal, o tegumento externo até ao nivel do póro genital é revestido de espinhos que na face ventral chegam até o limite dos $^3/_4$ anteriores do parazito. Os espinhos do tegumento externo vão se tornando mais raros e menores, á proporção que se aproximam da extremidade posterior.

Segmento cefalico:

O segmento cefalico é formado por uma orla ou gola espessa que cerca a ventoza bucal. Esta orla quazi circular é largamente chanfrada em lozango na face ventral. Na borda livre da orla inserem se os espinhos como cercadura, variando o numero delles nos diversos individuos, atinjindo no maximo a 36. Em um exemplar contámos 32 e em outro 33.

A inserção faz-se profundamente no tegumento externo. Os espinhos são cilindro-conicos com a extremidade livre afilada. O tamanho dos espinhos é variavel, sendo maiores aquelles que se aproximam da chanfradura ventral.

Os maiores medem de 156 a 160 *micra*, os menores de 134 a 140. São inseridos em uma unica fileira regular, tendo as pontas voltadas para a extremidade superior do verme. Ao nivel da chanfradura ventral a cuticula externa sofre um reviramento para baixo, de modo que, em geral, quatro espinhos ao mesmo tempo se voltam para dentro e tomam inserção um pouco mais acima da fileira regular, sotopondo-se aos que formam esta ultima.

A ventoza bucal acha-se situada no centro do segmento cefalico. E' quazi circular, porem achatada no sentido antero-posterior. Em seção transversal esta ventoza mostra contorno imperfeitamente circular, notando-se as paredes fortemente musculozas, constituidas sobretudo de fibras radiarias entre as quais se encontram, as bem conhecidas celulas nervozas:

brisk movements of extension and retraction, as well as a certain tendency to roll up.

Shape:

The specimens are canoe shaped with an attenuated oral and caudal extremity. The latter ends in a blunt protrusion. Between the oral and ventral sucker the worm is semewhat flattened and therewise somewhat, slender.

Surface:

Dorsally the external surface is provided with spines all along till the genital pore, and ventrally the spines cover $^3/_4$ of the surface of the worm. The spines grow smaller and rarer towards the posterior extremity.

The head:

The head consists of a thick expanded disc in the center of which there is the oral sucker. The almost circular disc shows ventrally a lozenge form hollow. The margin of the disc is set with a single row of spines varying in number. The largest number we could count was 36. One specimen had 32 and an other 33 apines. The spines are cylindro-conical with an attenuated extremity. They are deeply inserted in the skin surface. Varying in size, the largest ones are those near the lozenge form hollow.

The largest ones measure 134 to 140 micra. They mantain one straight line and their extremity points to the caudal end of the worm. At the level of the ventral hollow the cuticle turns downwards so that four of the spines are inward turned and inserted at a somewhat higher level than the regular line of insertion. The almost round sucker, situated in the center of the head is flattened antero-posteriorly. A transverse section shows that the mouth sucker is not quite round; microscopically the well developped muscles, consisting mostly of radical fibres and amongst these the well known nervous cells are to be seen.

The oral sucker measures 184 micra an-

As dimensões desta ventoza são:
Exemplar de 6,5 mm:
Diametro antero-posterior 184 *micra,*
» transverso 226 »
Exemplar de 6 mm:
Diametro antero-posterior 120 *micra,*
» transverso 152 »

Ventoza ventral:

Esta ventoza é bem dezenvolvida nesta especie, sendo muito maior que a bucal. Tem a fórma ovoide, cuja extremidade mais fina acha-se voltada para o polo posterior do corpo. Fica situada para o terço anterior do corpo, é saliente, fortemente musculoza, tendo a abertura mais ou menos circular voltada para o segmento cefalico:

As dimensões são as seguintes:
Exemplar de 7 mm.:
Diametro antero-posterior 1,11 mm
» transversal maximo 420 *micra*
Exemplar de 7 mm.:
Diametro antero-posterior 764 *micra*
» transversal maximo 736 »
Exemplar de 6 mm:
Diametro antero-posterior 792 *micra*
» transversal maximo 770 »

A distancia entre a ventoza anterior e posterior é em um exemplar de 7 mm de 550 *micra* e em um outro de 8 mm de 772 *micra.*

Póro genital:

O póro genital fica situado um pouco para traz da ventoza ventral e imediatamente para diante da bifurcação intestinal.

Anatomia interna

Aparelho dijestivo:

Este aparelho é formado de um muito curto prefaringe que nace no centro da ventoza bucal. Segue-se a este um farinje bem dezenvolvido, piriforme, de paredes fortemente musculozas e cuja luz examinada em seção transversal é triangular.

As dimensões são as seguintes:
Exemplar de 6,5 mm.:
Diametro antero-posterior 192 *micra*
» transversal maximo 180 »
Exemplar de 6,5 mm.:
Diametro antero-posterior 220 *micra*
» transversal 160 »

tero-posteriorly and 226 micra transversally in specimen 6,5 mm long and 120 micra antero-posteriorly and 152 micra transversally in specimen 6 mm long.

Ventral sucker:

In the anterior third of the worm lies the well developped ventral sucker ovoid in form and much larger than the oral sucker, the attenuated extremity is turned towards the caudal extremity. The muscles of the protruding ventral sucker are well developped. The more or iess circular orifice is iurned towards the cephalic extremity.

The ventral sucker measures 1,11 micra antero-posteriorly and 420 micra transversally in specimen 7 mm long, 764 micra antero-posteriorly and 736 micra transversally in specimen 7 mm, 792 micra antero-posteriorly and 770 micra transversally in specimen 6 mm long.

The space between the oral and ventral sucker measures 550 micra in spesimen 7 mm long and 772 micra in specimen 8 mm long.

Genital pore:

The genital pore is situated caudad of the ventral sucker and cephalad of the intestinal fork.

Internal anatomy.

Digestive tract:

Extending from the center of the oral sucker a very short prepharynx may be distinguished.

From the prepharynx rises a well developped, musculous, pear shaped pharynx; the lumen of the latter appears triangular in tranverse section.

The measurements in micra are the following:

Specimen
6,5 mm long 192 micra antero-posteriorly
180 » transversally
6,5 mm long 220 » antero-posteriorly
160 » transversally
7 mm long 228 » antero-posteriorly
222 » transversally

Exemplar de 7 mm.:

Diametro	antero-posterior	228 *micra*
»	transversal	222 »

Do faringe nace um ezofago curto e fino que se bifurca em *U* para formar os dois tubos cecais.

A bifurcação se faz em $^1/_{10}$ mais ou menos do comprimento total da borda da extremidade cefalica do corpo e imediatamente para traz da abertura genital.

Os dois cecos ou ramificações intestinais se colocam nas partes laterais do corpo junto ás bordas, contornando o *acetabulum,* ficando em parte cobertos pelas glandulas vitelojenas ás quais excedem um pouco na parte posterior do corpo, onde terminam em fundo de saco. Não aprezentam sinal de ramificação ou anastomoze:

Aparelho genital:

Orgãos masculinos: Os testiculos ficam situados na metade posterior do corpo entre os tubos intestinais. São implantados mais para a superficie ventral que para a dorsal; têm a fórma ovoide, o maior diametro sendo antero-posterior. São colocados, um logo apoz outro, sendo separados apenas por pequena faixa de tecido conjuntivo do parenquima.

O testiculo posterior é um pouco maior que o anterior; vistos em preparados *in-toto,* o contorno é perfeitamente regular, porem nos córtes aprecia-se uma nitida lobulação.

As dimensões dos testiculos são as seguintes:

Exemplar de 6,5 mm.:

Testiculo anterior:

Diametro	antero-posterior	600 *micra*
»	transverso	410 »

Testiculo posterior:

Diametro	antero-posterior	630 *micra*
»	transverso	410 »

Exemplar de 7,5 mm.:

Testiculo anterior:

Diametro	antero-posterior	680 *micra*
»	transverso	444 »

Testiculo posterior:

Diametro	antero-posterior	790 *micra*
»	transverso	400 »

De cada testiculo parte lateralmente um vazo efarente bem dezenvolvido e que se

From the pharynx springs a short slender and thin walled esophagus. At about one tenth of the total body length the esophagus divides in two cecal tubes which at first pass outward toward the lateral margins, follow these margins and then surround the acetabulum. Partly covered by the vitellogene glands they terminate at the caudal extremity free from these glands. There is no sign of anastomosis or ramifacation.

Genital system:

Male organs: The testicles lie in the caudal half of the worm in the area included between the intestinal ceca, somewhat nearer the ventral than the dorsal surface. Ovoid in form their largest diameter is the antero-posterior. One is directly caudad of the other; the two being separated one from the other by a narrow intervall occupied by connective tissue.

The posterior testicle is somewhat larger than the anterior. In press preparations their outlines are perfectly regular, but sections show them to be so markedly indented as to amount to a very distinct lobation.

The measurements of the testicles are the following:

Specimen 6,5 mm long

Anterior testicle	600	micra	antero-posteriorly
	410	»	transversally
Posterior testicle	630	»	antero-posteriorly
	410	»	transversally

Specimen 7,5 mm long

Anterior testicle	680	micra	antero-posteriorly
	444	»	transversally
Posterior testicle	790	»	antero-posteriorly
	400	»	transversally.

A well developped vas efferens rises laterally from each testicle. They are entirely full of spermatozoa. In spite of a large number of sections we could not follow the traject of these tubes.

Near the genital pore lies a large bilobated vesicula seminalis externa completely full

aprezenta literalmente cheio de espermatozoides. Não foi possivel seguir todo o trajeto destes tubos, apezar do grande numero de seções seriadas que praticámos.

Proximo á abertura genital encontra-se larga vezicula seminal externa ou masculina bilobada que se juxtapõe á ventoza ventral, aprezentando-se completamente cheia de espermatozoides e envolvida ainda em espessa membrana que envolve todo o complexo dos orgãos genitais externos. Esta vezicula seminal é muito bem dezenvolvida e tão grande que não hezitamos em consideral-a como caracteristica da especie em questão.

A bolsa do cirro é bem dezenvolvida, muito espessa e contem o penis, que é cilindro-conico, curto e de superficie liza. Tanto a vezicula seminal como o penis são cercados de numerozas celulas glandulares fuziformes que não trepidamos em considerar como elementos prostaticos.

O dezenho que produzimos dá perfeita idéa da descrição destes orgãos. (Est. 5, fig. 2).

Orgãos genitais femininos:

O ovario fica situado para diante dos testiculos, na linha mediana entre os 2 tubos intestinais e ocupa aproximadamente o meio do corpo. E' esferico, muito menor que os testiculos, tendo as seguintes dimensões:

Exemplar de 7 mm.: 290 *micra* de diametro
» de 6 mm.: 280 » » »

Colocado logo para traz do ovario encontra-se o ootipo, bem dezenvolvido de contorno ovoide, ocupando quazi toda a largura do animal e sempre cheio de espermatozoides e ovos em varios estados de maturação.

O ootipo recebe lateralmente os dois vitelodutos e posteriormente o canal de *Laurer* que é muito fino, mostrando-se completamente cheio de espermatozoides.

Como continuação do ootipo nace o utero que rodeia o ovario, prolongando-se para diante, descrevendo circumvoluções complicadas; depois, tornando-se mais simples contorna lateralmente a ventoza ventral, indo abrir-se no antro genital.

As glandulas vitelojenas, são dispostas nos campos laterais e estendem-se desde a ventoza ventral até ás extremidades dos dois cécos

of spermatozoa. The vesicula seminalis lays next to the ventral sucker and is covered by a thick membrane which envelops the external male organs. The vesicula is so large that we do not hesitate in considering it characteristic of the specimen which we are describing.

The well developped and quite thick cirrhus pouch contains the cylindro conical smooth surfaced penis. Both the vesicula seminalis and the cirrhus pouch are surrounded by numerous glandular cells which we do not hesitate to interpret as prostatic cells. (The drawing 2, plate 5 gives a perfect idea of the description of the male organs).

Female organs:

Cephalad of the testicles the interspace between the cecal tubes contains the ovary situated in the median line more or less in the middle of the total body length. The ovary is a globular body much smaller than the testicles and measures:

Specimen 7 mm long 290 micra in diameter
» 6 mm » 280 » » »

Caudad of the ovary lies the well developped, ovoid in form ootyp which occupies most the whole breadth of the worm. The ootyp contains always spermatozoa and ova in different phases of maturation.

The ootyp receives laterally the two vitelloducts and posteriorly Laurier's canal extremely narrow and entirely filled with spermatozoa.

From the ootyp appearing like a continuation there emerges the uterus which surrounds the ovary and then forms numerous coils; futher on, simpler, it surrounds laterally the ventral sucker and opens in the genital cavity.

The vitellogene glands lie in the lateral areas, beginning at the level of the ventral sucker and extending to the extremity of the cecal tubes, not exceeding the latter. These vitellaria are composed of a large number of

intestinais, sem exceder estes ultimos. Estas glandulas são formadas de grande numero de foliculos de contorno poligonal e grupados irregularmente, formando uma faixa de cada lado do corpo do animal.

Ovos:

Os ovos retirados do utero aprezentam-se com fórma oval e de côr amarello-parda que lhes é dada pelo envoltorio, aliaz pouco espesso.

O operculo é muito pequeno. O conteúdo é granulozo, sendo pouco nitidas as celulas que contem, que só são bem apreciadas nas costas. Estes ovos nunca contém embrião, apenas se observam as celulas destinadas a constituir o futuro miracidio.

Os ovos retirados dos exemplares maiores medem na media:

Diametro	long.	102 *micra*
»	transversal	50 »

Aparelho excretor:

Este aparelho em traços gerais é bem apreciavel no 5.º posterior do corpo e se compõe de um grosso trato mediano que se dicotomiza 2 vezes em Y, fôrmando, depois, outras pequenas ramificações. O trato mediano fórma pequena empola, logo depois da 1.ª dicotomização, vindo abrir-se no exterior no prolongamento terminal do corpo.

Diagnoze especifica:

Caraterizam suficientemente esta especie os seguintes dados anatomicos:

1.º A dispozição dos espinhos, na orla, em fileira unica regular, sendo alguns destes revirados para dentro, nas vizinhanças da chanfradura ventral.
2.º O numero de espinhos, que varía de 32 á 36.
3.º As dimensões das ventozas bucal e ventral, dos testiculos, ovario e ovos.
4.º A dispozição das glandulas vitelojenas, que se estendem desde a ventoza ventral até a terminação do céco.
5.º A dispozição dos orgãos genitais externos e, sobretudo, a enorme vezicula seminal bilobada cercada de glandulas prostaticas.
6.º O aparelho excretor, que forma na parte posterior do verme um duplo Y.

scattered irregularly, polygonal follicles, forming a band on each side of the worm.

Ova:

The uterine egg is oval in form owing to the membrane, in which it is inclosed and brownish yellow in colour.

The egg is provided with a very small operculum and contains a granular mass; the cells are only easily distinguished in sections. The eggs never contain embryos; one can only distingiush the cells which will form the future miracidium.

The average measurements of the eggs of the largest specimens were: 102 micra in length and 50 micra in width.

Excretory system:

In the posterior fifth of the body the excretory tract is single and median. The tract divides twice in two lateral branches, forming a double *Y* and further on in other smaller ramifications.

After the first division the tract dilates into a cavity and opens on the external surface in the caudal extremity of the body.

Specific diagnosis:

Disposition of the spines on the head disc in one straight line, some of wich are inward turned near the ventral hollow.

The number of spines varying from 32 to 36. The size of the oral and ventral sucker, testicles, ovary and ova. The disposition of the vitellogene glands wich extend from the oral sucker till the terminal end of the ceca. The disposition of the external genital organs and principally the enormous bilobated vesicula seminalis surrounded by prostatic glands. The excretory system that forms in the caudal extremity of the worm a double *Y*.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz
Tomo I - 1909

Estampa 5

ESTAMPA 5

PLATE 5

Ecchinostomum crotophagæ n. sp.

Fig. 1

a — ventoza bucal
b — farinje
c — ezofago
d — póro genital
e — vezicula seminal
f — penis
g — ventoza ventral
h — utero
i — vitelojenos
j — ovario
k — ootipo
l — testiculos
m — aparelho excretor
n — cécos
o — póro excretor

Fig. 2

Segmento cefalico

a — ventoza bucal
b — farinje

Fig. 3

Córte lonjitudinal ao nivel da vezicula seminal. Aumento = 232 vezes.

A — vezicula seminal
B — celulas prostaticas
C — penis
D — póro genital
E — utero
F — ventoza ventral

Fig. 1

a — oral sucker
b — pharinx
c — esophagus
d — genital pore
e — vesicula seminalis
f — penis
g — acetabulum
h — uterus
i — vitellaria
j — ovary
k — ootyp
l — testicles
m — excretory system
n — cecal tubes
o — excretory pore

Fig. 2

Head

a — oral sucker
b — pharynx

Fig. 3

Sagittal section showing vesicula seminalis
Enlarged $\frac{}{E}$ 232

A — vesicula seminalis
B — prostatic cells
C — penis
D — genital pore
E — uterus
F — acetabulum

ad. nat. del.

intestinais, sem exceder estes ultimos. Estas glandulas são formadas de grande numero de foliculos de contorno poligonal e grupados irregularmente, formando uma faixa de cada lado do corpo do animal.

Ovos:

Os ovos retirados do utero aprezentam-se com fórma oval e de [illegible] amarello-parda que lhes é dada pelo envoltorio, aliaz pouco espesso.

O operculo é muito pequeno [illegible] é granulozo, sendo [illegible] que contem, que só são bem apreciadas nas costas. Estes ovos nunca [illegible] embrão, apenas se observam as celulas [illegible] a constituir o futuro miracidio.

Os ovos retirados dos [illegible] maiores medem na media:

Diametro long. [illegible]

» transversal [illegible]

Aparelho excretor:

Este aparelho em traços [illegible] apreciavel no 5.º posterior do corpo [illegible] de um grosso trato mediano [illegible] dicotomiza 2 vezes em Y, formando [illegible] pequenas ramificações [illegible] pequena empola, logo depois da dicotomização, vindo abrir-se [illegible] no prolongamento terminal do corpo.

Diagnoze especifica:

Caraterizam suficientemente esta especie os seguintes dados anatomicos:

1.º A dispozição dos espinhos, na orla, em fileira unica regular, sendo alguns destes revirados para dentro, nas vizinhanças da chanfradura ventral.

2.º O numero de espinhos, que varia de 32 a 36.

3.º As dimensões das ventozas bucal e ventral, dos testiculos [illegible].

4.º A dispozição das glandulas [illegible], que se estendem desde a ventoza ventral até a terminação do céco.

5.º A dispozição dos orgãos genitais externos e, sobretudo, a enorme vesicula seminal bilobada cercada de glandulas prostaticas.

6.º O aparelho excretor, que forma na parte posterior do verme um duplo Y.

scattered irregularly, polygonal follicles, forming a band on each side of the worm.

Ova:

The uterine egg is oval in form owing to the membrane, in which it is inclosed and brownish yellow in colour.

The egg is provided with a very small [illegible] contains a granular mass; the [illegible] distinguished in sections. The eggs never contain embryos; one can only distingiush the cells which will form the future miracidium.

The average measurements of the eggs of the largest specimens were: 102 micra in length and 50 micra in width.

Excretory system:

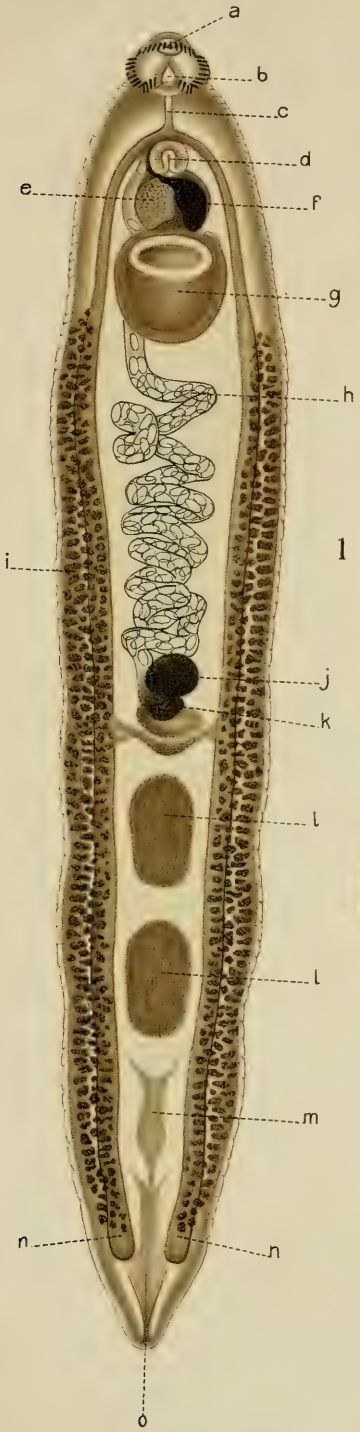
In the posterior fifth of the body the excretory tract is single and median. The tract divides twice in two lateral branches, forming a double Y and further on in other smaller ramifications.

After the first division the tract dilates into a cavity and opens on the external surface in the caudal extremity of the body.

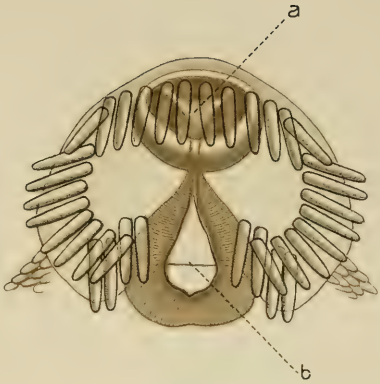
Specific diagnosis:

Disposition of the [illegible] the head disc in one straight line, some of wich are inward turned near the ventral hollow.

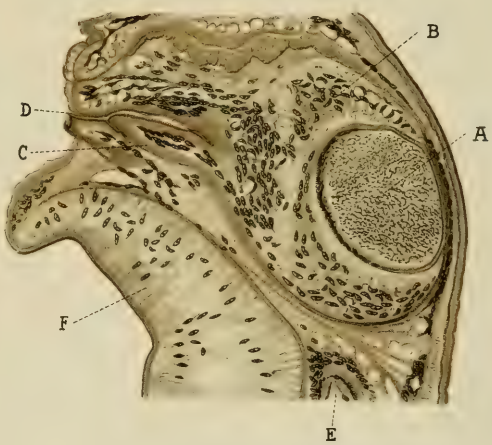
The number of spines varying from 32 to 36. The size of the oral and ventral sucker, testicles, ovary and ova. The disposition of the vitellogene glands wich extend from the oral sucker till the terminal [illegible] of the ceca. The disposition of the [illegible] genital organs and principally the enormous bilobated vesicula seminalis surrounded by prostatic glands. The excretory system that forms in the caudal extremity of the worm a double Y.



1



2



3

CASTRO SILVA
ad. nat. del.

Duplicidade morfolojica nos infuzorios ciliados

pelo

Dr. S. von Prowazek

(Estampa 6)

Formdimorphismus bei ciliaten Infusorien

von

Dr. S. von Prowazek

(Tafel 6)

Foi MAUPAS o primeiro que descobriu a duplicidade morfolojica no infuzorio ciliado *Leucophrys patula Ehrb.* e ligou o fato a um fenomeno sexual desse interessante infuzorio. O *Leucophrys patula* possue 2 fórmas: uma grande, de movimentos muito ativos, que cambaleando e girando multîplas vezes em torno de seu eixo nada no infuzo em que vive; já MAUPAS estabeleceu com justeza suas carateristicas morfolojicas. A fig. 1 mostra sua estrutura: o citostoma é grande e provido de 2 membranulas em fórma de labios. Abaixo do citofarinje nota-se um grande alveolo alongado. Esta grande fórma de infuzorio de rapina engole em quantidades consideraveis pequenos infuzorios e, em pouco tempo, seu endoplasma se enche de vacuolos nutritivos, fortemente refrinjentes. Os infuzorios deglutidos que se movem ainda durante certo tempo no interior dos vacuolos tornam-se, no fim de 10′, um tanto refrinjentes e coram-se em avermelhado pelo *Neutralrot;* em mais ou menos 20′, paralizam-se e tomam então a conhecida côr vermelha do *Neutralrot* que traduz a reação *acida.* Mais tarde, mercê da reação alcalina dos fermentos dijestivos, essa coloração muda para vermelho amarelado. Os restos alimentares não dijeridos são eliminados para o exterior atravez um

MAUPAS hat zuerst bei dem ciliaten Infusorium *Leucophrys patula* Ehrb. einen Formdimorphismus entdeckt und brachte ihn mit den *sexuellen* Erscheinungen dieses interessanten Infusors in Zusammenhang. *Leucophrys patula* besitzt 2 Formen: eine grosse, lebhaft bewegliche Form, die schwankend, vielfach um ihre Achse rotierend, in der Infusion dahinschwimmt; ihre morphologische Eigentümlichkeiten sind bereits von MAUPAS zutreffend geschildert worden. Ihr Aufbau geht aus Figur 1 hervor; das Cytostom ist gross und mit zwei lippenförmigen Membranellen ausgestattet. Unter dem Cytopharynx nimmt man meist eine grosse, längliche Aveole wahr. Diese grosse, räuberische Form verschlingt in beträchtlicher Menge kleine Infusorien und ihr Endoplasma ist bald erfüllt von stark lichtbrechenden Nahrungsvakuolen. Die aufgenommenen Infusorien bewegen sich noch eine zeitlang in der Nahrungsvakuole, werden jedoch nach etwa 10 Minuten etwas lichtbrechend und färben sich mit Neutralrot in einer rötlichen Nüance; nach ungefähr 20 Minuten sind sie zumeist gelähmt und nehmen den bekannten, *sauern* roten Farbton des Neutralrots an. Später schlägt diese Nüance unter Einfluss der alkalisch reagierenden Verdauungsfermente in ein Gelbrot um. Die unverdauten Nahrungs-

citopijio de formação temporaria. Essa excreção se faz sob a fórma de bolos, cuja côr primitiva se acha empalidecida, manifestando-se esta agóra com uma tonalidade vermelha lilaz. Na temperatura de cerca de 28º C. o vacuolo contratil pulsa por 10 a 14 segundos.

Ao lado dum grande macronucleo rico em cromatina e que ás vezes possue um cariozoma, (Est. 6 Fig. 2, 3) vê-se um micronucleo menor, compacto e que, segundo o modo comum, se divide mitozicamente (Est. 6 Fig. 2) como os pequenos nucleos dos infuzorios. O caryozoma do grande nucleo, que falta muitas vezes completamente, sofre processos ciclicos e, óra aprezenta-se perfeitamente formado, óra dezaparece por completo. (Est. 6 Fig. 2 e 3; 1) Em determinado estadio da divizão celular, aprezenta contornos perfeitamente nitidos, tornando-se indistinto logo que o nucleo se estira lonjitudinalmente. O grande nucleo multiplica-se por divizão direta; por ocazião de seu estrangulamento, uma parte de cromatina, que claramente, em parte, pertence ao cariozoma, reune-se no meio do nucleo em ampulheta, sob a fórma de um botão e, por ocazião dos subsequentes estadios da divizão *elimina-se* (Est. 6 Fig. 7 a 10.) Essa massa de cromatina, que permanece apenas em *uma* das porções divididas (Est. 6 Fig. 10, 11, 12) reune-se em bola, dejenera e é finalmente *eliminada*. Deste modo se verifica que, *independentemente* do estrangulamento do corpo celular, se dá *em cada vez uma diminuição da cromatina*, por ocazião da divizão celular. Em uma serie de trabalhos anteriores foi estabelecido o fato de que o cariozoma das celulas dos protozoarios corresponde a um segundo nucleo. De acôrdo com essa concepção, as celulas dos ciliados. que possuem dous nucleos morfolojicamente diferenciados: o macro e o micronucleo, tornam-se, em determinados estadios, quadrinucleados, desde que nesses dous nucleos apareçam cariozomas. O centrozomio dos metazoarios corresponde filojeneticamente ao cariozoma dos protozoarios e, sendo assim, deve-se fazer corresponder o *Spindelrestkoerper* de *Flemming* ou o corpo intermediario do fuzo central ao *Diminutionskoerper* do cario-

reste werden am Hinterende des Infusors durch eine temporär entstehende Cytopyge in Ballenform nach aussen abgestossen und blassen über ein eigenartiges Lilarot alsbald ab. Die kontraktile Vakuole pulsiert bei einer Temperatur von ca. 28º C. in 10 bis 14 Sekunden.

Neben dem grossen chromatinreichen Macronucleus, der zuweilen ein Caryosom besitzt (Taf. 6, Fig. 2, 3), liegt ein kleiner, kompakter Micronucleus, der sich nach Art der Kleinkerne der Infusorien in der üblichen Weise mitotisch teilt (Taf. 6, Fig. 2). Das Caryosom des Grosskerns, das oft gänzlich fehlt, unterliegt zyklischen Prozessen und ist bald deutlich ausgebildet, bald verschwindet es vollkommen (Taf. 6, Fig. 2 u. 3). Auf einem gewissen Stadium vor der Zellteilung ist es ziemlich scharf abgegrenzt und wird erst undeutlich, sobald sich der Kern der Länge nach streckt. Der Grosskern teilt sich auf direkte Weise; bei der Durchschnürung desselben wird ein Teil des Chromatins, das offenbar teilweise dem Caryosom angehört, in der Mitte des hantelförmigen Kerns, in der Form eines Knotens zusammengeballt und bei der weiteren Teilung aus dem Kern *eliminiert* (Taf. 6, Fig. 7 bis 10). Bald klumpt diese Chromatinmenge, die nur in dem *einen* Teilsprössling liegen bleibt (Taf. 6, Fig. 10 u. 11), zu einem Ballenkörper zusammen, degeneriert und wird schliesslich *ausgestossen*. Es findet derart *unabhängig* von der Zellleibdurchschnürung eine *jedesmalige Diminution des Chromatins* bei der Zellteilung statt. In einer Reihe von früheren Arbeiten wurde der Nachweis erbracht, dass das Caryosom der Protozoenzelle einem zweiten Kern entspricht. Auf Grund dieser Betrachtungen wäre die Ciliatenzelle, die 2 morphologisch differenzierte Kerne als Macro- und Micronucleus besitzt, auf gewissen Stadien vierkernig, sobald in diesen beiden Kernen Caryosome auftreten. Phylogenetisch entspricht dem Centrosom der Metazoenzelle das Caryosom der Protozoenzelle und daher muss man den Spindelrestkörper FLEMMING'S oder den Zwischenkörper der Centralspindel mit dem eben beschriebenen Diminutionskörper des Caryosoms der ciliaten Zelle vergleichen. Bei *Leucophrys* fällt die Diminution des Kern-

zoma das celulas dos ciliados, acima descritos. No *Leucophrys* a diminuição da cromatina nuclear não coincide, em tempo, com o estrangulamento plasmatico, como é o cazo nas celulas dos metazoarios e metafitos. Póde-se comparar morfolojicamente os corpos intermediarios dos esparmatocitos da *Helix* diretamente com as porções de diminuição do cariozoma do *Leucophrys*.

A outra fórma do *Leucophrys* dimorfo (Est. 6 Fig. 4, 5, 6, 13 e 14) é essencialmente menor, a boca é semelhante á do *Glaucoma pyriformis* como tambem esta fórma póde ser facilmente confundida com o *Glaucoma*. Contrariamente á outra fórma descrita do *Leucophrys*, que devora pequenos protozoarios, alimenta-se esta de materiais nutritivos que vèm em remoinhos impelidos pelos cilios e que são constituidos, sobretudo, de bacterios. E' digno de nota que nesta pequena fórma semelhante ao *Glaucoma falta* muitas vezes o micronucleo, que parece ter *imigrado* para o interior do macronucleo. (Est. 6 Fig. 5 e 13).

Que significação tem esse diformismo? MAUPAS considera a fórma pequena, em que muitas vezes falta o citostoma, como o *animal sexuado*. Na maioria dos cazos consegui pela adição de quinina a 1:80000 obter culturas das fórmas grandes de *Leucophrys* provenientes das pequenas e que se aprezentavam nas culturas, no fim de 3 dias, que se multiplicavam no fim de 4 e que, mais tarde de novo davam orijem a fórmas pequenas. Nunca verifiquei a existencia de conjugação e por isso, contrariamente a MAUPAS *não* considero como baze do dimorfismo dos infuzorios a sexualidade; aceito, de preferencia, a concepção inedita de SCHAUDINN, assim como os rezultados experimentais de ENRIQUES sobre o *Chilodon*, de que os protozoarios *já* se acham diferencialmente *sexuados*, mas que apenas a sexualidade nem sempre se estampa no sentido morfolojico como nos hemosporidios e em varios coccidios *(Cyclospora)*. Teoricamente estou inclinado a aceitar que nos protozoarios se observa uma *geração alternante* de especie primaria, que tambem se póde separar em 2 modalidades diversas de processos sexuais. Nos Testacios, segundo SWARCZEWSKY und ZÜLZER eine Chromidiogamie

chromatins zeitlich nicht mit der Plasmadurchschnürung zusammen, was bei den Metazoen- und Metaphytenzellen stets der Fall ist. Die Zwischenkörper der Spermatocyten von *Helix* kann man morphologisch direkt mit den Diminutionsteilen des Caryosoms von *Leucophrys* vergleichen.

Die andere Form der dimorphen *Leucophrys* (Taf. 6, Fig. 4, 5, 6, 13 u. 14) ist wesentlich kleiner, ihr Mund ist dem von *Glaucoma pyriformis* ähnlich, wie überhaupt diese Form leicht mit *Glaucoma* verwechselt werden kann. Im Gegensatz zu den zuerst geschilderten Leucophrysstadium, das kleinere Protozoen verschlingt, ernährt sie sich durch Zustrudeln von Nahrung, die vorwiegend bakterieller Natur ist. Bemerkenswert ist, dass bei dieser kleinen glaucomaähnlichen Form der Micronucleus vielfach *fehlt;* er scheint in das Innere des Macronucleus *einzudringen* (Taf. 6, Fig. 5, 13).

Welche Bedeutung besitzt nun dieser Dimorphismus? MAUPAS fasste die kleineren Formen, deren Cytostoma öfters verschwindet, als *Sexualtiere* auf. Mir gelang es in der Mehrzahl der Fälle, durch Zusatz von Chinin 1 : 80.000 aus den kleinen Formen die grossen *Leucophrys* zu züchten, die in den Kulturen zumeist am 3. Tage auftauchten, sich am 4. Tage vermehrten und später wieder in die kleineren Formen umbildeten. Nie wurde von mir eine Conjugation beobachtet und ich sehe daher im Gegensatz zu MAUPAS die Sexualität *nicht* als Grund für den Dimorphismus der Infusorien an, nehme vielmehr im Anschluss an nicht veröffentlichte Ideen von SCHAUDINN sowie an die Ergebnisse der Experimentaluntersuchungen von ENRIQUES an *Chilodon* an, dass die Protozoen *stets sexuell* differenziert sind, nur dass die Sexualität nicht immer derart im morphologischen Sinne ausgeprägt ist wie bei den Hämosporidien und manchen Coccidien *(Cyclospora)*. Theoretisch bin ich geneigt anzuuehmen, dass bei den Protozoen überhaupt ein *Generationswechsel primärer* Art vorkommt, der sogar mit zwei Modi von sexuellen Vorgängen abschliessen kann. Bei den Testaceen tritt nach SWARCZEWSKY und ZÜLZER eine Chromidiogamie

CZEWSKI e ZUELZER ocorre a cromidiogamia ao lado da heterogamia. Conhece-se tambem no ciclo evolutivo de *Trichomonas* e do *Bodo lacertae* a heterogamia, ao lado do processo autogamico muito mais conhecido. (*) De outro lado, conhecemos em alguns protozoarios duplicidade de fórmas de multiplicação vejetativa: no plasmodio da malaria humana e da do macaco foi observada, ao lado de multipla esquizogonia, tambem, a simples multiplicação dos *merontes (pedogomia)*. O mesmo parece se dar nos coccidios. Nos infuzorios as entidades morfolojicamente eguais de *Glaucoma* e *Colpidium* etc. separam-se fiziolojicamente em duas series, das quais uma é muito mais *rezistente* que a outra ás substancias ou alcaloides que ajem por osmoze Em favor de uma alternancia de geração tambem caraterizavel morfolojicamente falam ainda as observações de von LEBEDEW sobre a primitiva *Trachelocerca* ou de JOSEPH sobre o *Loxodes*.

(*) Sem duvida, deve-se notar que nestes dois cazos não se verifica a dupla fecundação, porque, segundo HARTMANN, em um cazo (Cromidiogamia dos testacios) deve-se tratar, apenas, de plastogamia e, no outro (autogamia do Bodo) de modificação da heterogamia habitual, isto é, partenogamia (Hartmann, Autogamie bei Protisten, Jena, 1909).

neben einer Heterogamie auf; aus dem Entwicklungszyklus von *Trichomonas* und *Bodo lacertae* ist sowohl eine Heterogamie, als die viel häufigere Autogamie bekannt. (*) Andererseits kennen wir von einigen Protozoen wiederum *zwei* Arten von vegetativer Vermehrung; bei den Malariaplasmodien des Menschen und der Affen ist neben einer multiplen Schizogonie auch eine einfache Vermehrung der Meronten (Paedogonie) beobachtet worden. Auch bei den Coccidien scheinen ähnliche Verhältnisse vorzuliegen. Bei den Infusorien spalten sich die morphologisch gleichartigen Formen von *Glaucoma, Colpidium* u. a. physiologisch insofern in *zwei* Reihen, als die einen Formen osmotisch wirksamen Substanzen oder Alkaloiden gegenüber viel *resistenter* sind. Für einen sogar morphologisch nachweisbaren Generationswechsel sprechen aber die Beobachtungen von LEBEDEW an der primitiven *Trachelocerca* oder von JOSEPH an *Loxodes*.

(*) Allerdings muss bemerkt werden, dass in diesen beiden Fällen die doppelte Befruchtung nicht bewiesen ist, da es sich nach HARTMANN in dem einen Fall (Chromidiogamie der Testaceen) nur um eine Plastogamie, im andern (Autogamie von *Bodo*) um eine Modifikation der gewöhnlichen Heterogamie, nämlich eine Parthenogamie, handeln soll (Hartmann, Autogamie bei Protisten, Jena 1909).

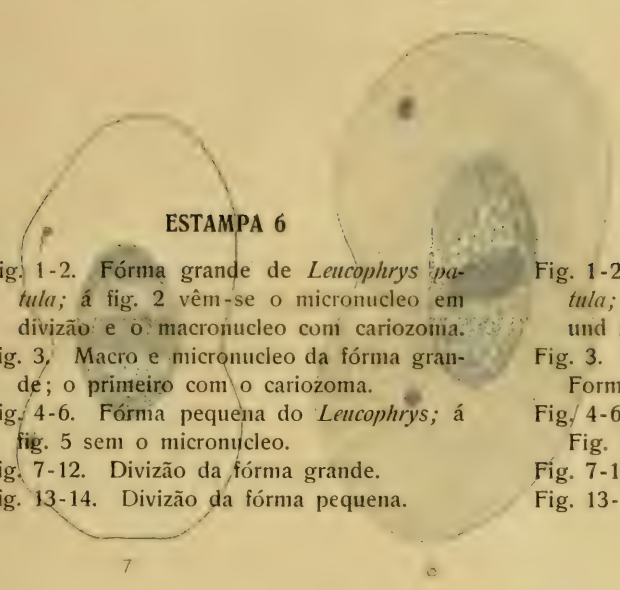
ESTAMPA 6

ESTAMPA 6

Fig. 1-2. Fórma grande de *Leucophrys patula;* á fig. 2 vêm-se o micronucleo em divizão e o macronucleo com cariozoma.
Fig. 3. Macro e micronucleo da fórma grande; o primeiro com o cariozoma.
Fig. 4-6. Fórma pequena do *Leucophrys;* á fig. 5 sem o micronucleo.
Fig. 7-12. Divizão da fórma grande.
Fig. 13-14. Divizão da fórma pequena.

TAFEL 6

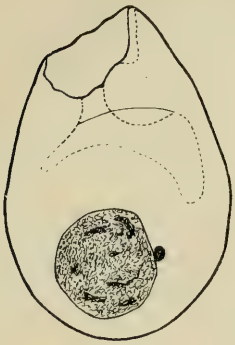
Fig. 1-2. Grosse Form von *Leucophrys patula;* in Fig. 2 Micronucleus in Teilung und Macronucleus mit Caryosom.
Fig. 3. Macro- und Micronuclei der grossen Form; erstere mit Caryosom.
Fig. 4-6. Kleine Form von *Leucophrys;* in Fig. 5 ohne Micronucleus.
Fig. 7-12. Teilung der grossen Form.
Fig. 13-14. Teilung der kleinen Form.

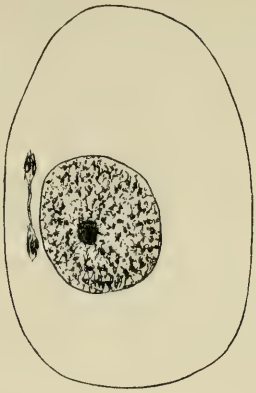


CZEWSKI e ZUELZER ocorre a cromidiogamia ao lado da heterogamia. Conhece-se tambem no ciclo evolutivo de *Trichomonas* e do *Bodo lacertae* a heterogamia, ao lado do processo autogamico muito mais conhecido. (*) De outro lado, conhecemos em alguns protozoarios duplicidade de fórmas de multiplicação vejetativa: no plasmodio da malaria humana e da do macaco foi observada, ao lado de multipla esquizogonia, tambem, a simples multiplicação dos *merontes (pedogonia)*. O mesmo parece se dar nos coccidios. Nos infuzorios as entidades morfologicamente [illegible] de *Glaucoma* e *Colpidium* [illegible] fisiologicamente em duas series, das quais uma é muito mais *resistente* que a outra ás substancias ou alcaloides que ajem por osmoze. Em favor de uma alternancia de geração tambem [illegible] morfologicamente falam ainda as observações de von LEBEDEW sobre a primitiva [illegible] de JOSEPH [illegible]

neben einer Heterogamie auf; aus dem Entwicklungszyklus von *Trichomonas* und *Bodo lacertae* ist sowohl eine Heterogamie, als die viel häufigere Autogamie bekannt. (*) Andererseits kennen wir von einigen Protozoen wiederum *zwei* Arten von vegetativer Vermehrung; bei den Malariaplasmodien des Menschen und der Affen ist neben einer multiplen Schizogonie auch eine einfache Vermehrung der Meronten (Paedogonie) beobachtet worden. Auch bei den Coccidien scheinen ähnliche Verhältnisse vorzuliegen. Bei den Infusorien spalten sich die morphologisch gleichartigen Formen von *Glaucoma, Colpidium* u. a. physiologisch insofern in *zwei* Reihen, als die einen Formen osmotisch wirksamen Substanzen oder Alkaloiden gegenüber viel *resistenter* sind. Für einen sogar morphologisch nachweisbaren Generationswechsel sprechen aber die Beobachtungen von LEBEDEW an der primitiven Trachelocerca oder von JOSEPH an [illegible]

[illegible] (Chromidiogamie der Testaceen) nur um eine [illegible] mie, [illegible] (Autogamie der Testaceen) [illegible] kation der gewöhnlichen Heterogamie, nämlich eine Parthenogamie, handeln soll (Hartmann, Autogamie bei Protisten, Jena, 1909).


1


2

3

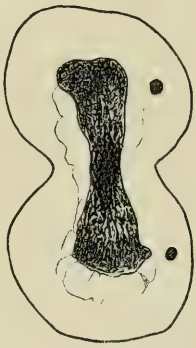
4

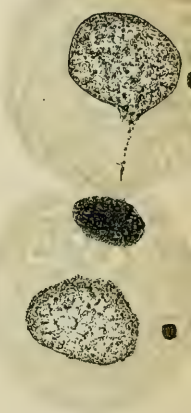
5

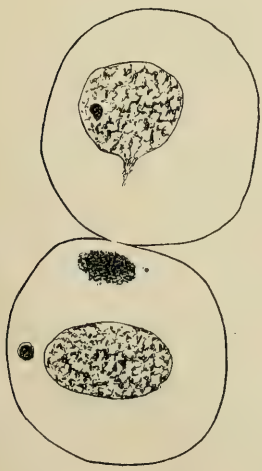
6

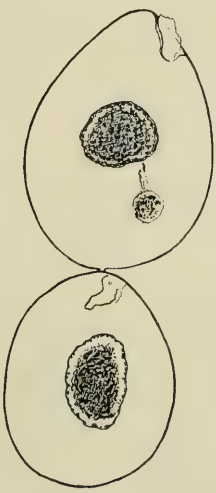
7

8


9


10


11


12

13

14

Da pesquiza de antijeno e de anticorpo pela fixação de complemento

pelo

Dr. Arthur Moses.

Ueber den Nachweis von Antigen und Antikörper durch Komplementablenkung

von

Dr. Arthur Moses.

O diagnostico precizo e rapido das molestias infetuosas de grande alcance para fins profilaticos e terapeuticos, outrora, dependente da verificação microscopica do germen, consegue-se hoje, pesquizando os anticorpos especificos elaborados pelos microorganismos, ajentes da infeção.

A aglutinação constitue, apoz os trabalhos de GRUBER e WIDAL prova robusta de diagnostico, principalmente, nas infeções cauzadas pelos germens do grupo coli-tifo; a pesquiza de bacteriolizinas no soro dos doentes entrou para a pratica clinica com os estudos de STERN e para o diagnostico da infeção stafilococica aconselham, de longa data, BRUCK, MICHAELIS e SCHULTZE a verificação no sangue da stafiloantilizina.

Tornou-se mais lata a aplicação pratica da pesquiza de anticorpos, apoz os estudos de BORDET e GENGOU que revelaram na mór parte dos soros microbianos a prezença de produtos de reação especifica.

Não nos deteremos no estudo da natureza desses anticorpos. Na Alemanha NEUFELD que com especial cuidado estudou o assunto opina pela existencia de novo anticorpo diferente dos já descritos, creando para elle a denominação de *anticorpo* de BORDET. Em recente revista historica e critica sobre fixação de

Eine sichere und schnelle Diagnose der Infektionskrankheiten ist für prophylaktische und therapeutische Zwecke von grosser Bedeutung; während dieselbe früher vom mikroskopischen Nachweise des Erregers abhing, erreicht man sie heute durch den Nachweis der spezifischen Antikörper, welche durch die Infektionsträger hervorgerufen werden.

Seit den Arbeiten von GRUBER und WIDAL bildet die Agglutination einen wichtigen Beweis für die Diagnose, besonders bei Infektionen, welche durch Bakterien der Coli-Typhusgruppe verursacht werden; der Nachweis von Bakteriolysinen im Blutserum der Kranken wurde durch die Studien von Stern in die klinische Praxis eingeführt und BRUCK, MICHAELIS und SCHULTZE empfahlen schon vor langer Zeit für die Diagnose der Staphylocokkeninfektion das Aufsuchen des Staphyloantilysins im Blute; die praktische Anwendung des Antikörpernachweises wurde jedoch erst durch die Studien von BORDET und GENGOU verallgemeinert, da dieselben in dem grössten Teil der Mikrobiensera die Gegenwart von spezifischen Reaktionsprodukten erwiesen. Ich will mich hier nicht mit dem Studium der Natur dieser Antikörper aufhalten.

In Deutschland ist NEUFELD, welcher den Gegenstand besonders sorgfältig studirte, der Ansicht, dass ein neuer Antikörper existirt,

complemento é essa opinião contestada por BORDET que persiste em responsabilizar pelo fenomeno a que ligou o nome umanti corpo da natureza de amboceptor.

Essa determinação indireta do ajente da entidade morbida só é aplicavel nos cazos em que o organismo se acha durante algum tempo sob a ação do germen de modo a poder elaborar anticorpos, o que equivale a dizer que é limitada sua aplicação.

Necessario seria possuir um metodo biolojico, não da demonstração de anticorpos, mas da pesquiza direta do microorganismo. Para substituir os morosos processos de verificação microscopica e estudo das propriedades culturais dos germens izolados dos humores organicos deram-nos WASSERMANN e BRUCK um metodo biolojico bastante sensivel, que consiste na pesquiza direta do ajente da infeção, ou melhor, de particulas de destruição do mesmo. E' esse metodo aplicavel nos primeiros dias de infeção, quando ainda não é possivel a pesquiza de anticorpos.

Conhecido um dos elementos facil se torna ajuizar da prezença do outro tomando para indice a fixação de complemento.

Com a modificação introduzida por WASSERMANN e BRUCK na primitiva tecnica de BORDET tornou-se a reação, hoje, geralmente denominada de BORDET e GENGOU um preciozo auxiliar de diagnostico. Consiste a modificação no emprego de extratos bacterianos em logar das emulsões aconselhadas por *Bordet.*

Com o fim de nos certificarmos do valor que tem a reação para o diagnostico de molestias infetuosas realizámos uma serie de pesquizas de antijeno e anticorpo, quer em cazos clinicos quer em infeções animaes espontaneas e experimentaes.

Antes de abordarmos a aplicação pratica daremos de modo sucinto o metodo de trabalho. O complemento era fornecido por soro normal de 24 horas, conservado durante esse tempo no aparelho *Frigo* de *Morgenroth*, si bem que, tivessemos verificado no correr dos trabalhos que no *Frigo* se mantem inalteravel o soro durante 48 horas. Precedia qualwelcher von den schon beschriebenen verschieden ist und für den er die Bezeichnung «*Antikörper von Bordet*» aufgestellt hat. Diese Auffassung wird von BORDET in einer neuen, historischen und kritischen Bearbeitung der Komplementablenkung zurückgewiesen, indem er fortfährt, die nach ihm benannte Erscheinung auf einen Antikörper von Amboceptornatur zurückzuführen.

Diese indirekte Bestimmung des Krankheitserregers lässt sich nur in den Fällen anwenden, in welchen der Organismus einige Zeit unter dem Einfluss desselben gestanden hat, so dass er Antikörper bilden konnte, d. h., sie findet nur eine beschränkte Anwendung. Es wäre am Platze, eine neue biologische Methode zu finden, welche nicht zum Nachweise der Antikörper, sondern zur direkten Bestimmung des Erregers dient. Als Ersatz der zeitraubenden Prozesse, welche dem mikroskopischen Nachweise und dem Studium der Kultureigenschaften der aus den Körpersäften isolirten Keime dienen, haben WASSERMANN und BRUCK eine ziemlich empfindliche biologische Methode angegeben; dieselbe besteht in direktem Nachweis des Krankheitserregers oder richtiger der Zerstörungsprodukte derselben. Diese Methode lässt sich bereits in den ersten Krankheitstagen anwenden, wenn der Nachweis des Antikörpers noch nicht möglich ist.

Wenn das eine Element bekannt ist, so lässt sich die Gegenwart des anderen leicht beurteilen, indem man die Komplementablenkung zum Nachweise benützt. In der von WASSERMANN und BRUCK eingeführten Modification der ursprünglichen BORDET'schen Technik bildet heute die, gewöhnlich nach BORDET und GENGOU benannte, Reaktion, ein wertvolles Hilfsmittel für die Diagnose. Die Modification besteht in der Anwendung von Bacterienextrakten an Stelle der von BORDET empfohlenen Emulsionen.

Um mich von der Bedeutung zu überzeugen, welche die Reaktion für die Diagnose der Infektionskrankheiten besitzt, führte ich eine Reihe von Antigen- und Antikörper-Untersuchungen aus und zwar sowohl in klinischen Krankheitsfällen, als auch bei spontanen und experimentellen Tierinfektionen.

quer ensaio a dozajem do soro hemolitico e do complemento e a verificação da quantidade de antijeno ou de humor organico em que existia anticorpo que exercia sobre o sistema hemolitico ação impediente de modo a não exceder nas experiencias a metade dessa quantidade.

Do preparo do antijeno diremos mais por miudo a propozito de cada infeção estudada; podemos aqui adiantar que do emprego comparativo das emulsões e dos extratos bacterianos concluimos que não era necessario empregar elevadas quantias de emulsão nos cazos em que fôra suficiente um minimo de extrato; a vantajem da tecnica de WASSERMANN e BRUCK consiste na possibilidade de obter rezultados quantitativos pelo emprego de antijeno de valor quazi constante.

Terminados os ensaios previos, é possivel investir os dois problemas que se oferecem na fixação de complemento: pesquiza de antijeno e de anticorpo.

Eram os ensaios realizados em tubos de 5 cm. de altura e 1 de diametro colocados em suporte lastrado dentro de um termostato do tipo OSTWALD, em que um termoregulador de mercurio mantem constante a temperatura de 37°. Consoante a tecnica seguida pela maioria dos pesquizadores realizamos cada ensaio em 3 horas (1 hora de absorção e 2 de hemolize). Convencionamos traduzir pelos sinais —, +, ++, +++ o rezultado das experiencias; — indica auzencia de hemolize; + denota sombra de hemolize; ++ indica hemolize incompleta e +++ hemolize total.

Rezumem-se em 9 cazos de infeção tifica, 38 de peste e 3 de dizenteria bacilar os cazos clinicos em que aplicamos a reação de BORDET.

Dos 9 cazos de infeção tifica foi quatro vezes o diagnostico confirmado pela cultura do bacilo, em um cazo izolado das fezes, em outro do sangue, em um terceiro do sangue e da urina e finalmente em um quarto do baço em autopsia.

Em duas das quatro observações citadas concorreu ainda para firmar o diagnostico a

Bevor ich auf die praktische Anwendung eingehe, beschreibe ich kurz die angewandte Methode:

Das Komplement wurde von 24 Stunden altem Normalserum geliefert; dasselbe wurde, während der angegebenen Zeit, im Apparat «*Frigo*» von MORGENROTH aufbewahrt; übrigens habe ich im Laufe der Arbeit festgestellt, dass das Serum sich im «*Frigo*»-Apparate auch während 48 Stunden unverändert erhält. Vor jedem Versuche wurde hämolytisches Serum und Komplement dosirt und die Menge von Antigen oder antikörperhaltiger Organflüssigkeit festgestellt, welche auf das hämolytische System keine hindernde Wirkung ausübte, wobei jedoch im Versuche die Hälfte dieser Menge nicht überschritten wurde.

Auf die Herstellung des Antigens werde ich bei den einzelnen untersuchten Infektionen näher eingehen; ich schicke nur voraus, dass die vergleichsweise Anwendung der Emulsionen und Bakterienextrakte mich überzeugte, dass man keine grossen Emulsionsmengen anzuwenden braucht, wo ein Minimum von Extrakt genügt; der Wert der WASSERMANN und BRUCK'schen Technik besteht vielmehr in der Möglichkeit, quantitative Resultate durch Anwendung eines Antigens von nahezu konstantem Werte zu erhalten. Nach Abschluss der Vorversuche kann man die zwei Probleme angehen, welche sich bei der Komplementablenkung darbieten, nähmlich das Aufsuchen des Antigens und dasjenige des Antikörpers. Die Versuche wurden in Glasröhrchen von 1 cm. Durchmesser und 5 cm. Höhe ausgeführt; dieselben wurden in einem zweckmässigen Ständer in einen OSTWALD'schen Thermostaten gebracht, in welchem ein Quecksilberregulator eine konstante Temperatur von 37° erhielt. Bei der in der Mehrzahl der Fälle angewandten Technik nahm jeder Versuch drei Stunden in Anspruch (eine für die Absorption und zwei für die Hämolyse). Die Resultate der Versuche werden durch die konventionellen Zeichen: —, +, ++, +++ ausgedrückt; — bedeutet Fehlen der Hämolyse; + eine Spur derselben, ++ unvollständige, +++ totale Hämolyse.

Die klinischen Fälle, bei denen ich die

reação de WIDAL. Nos cinco observandos restantes confirmámos pelo rezultado pozitivo da aglutinação o diagnostico clinico.

Seis vezes verificamos a prezença de anticorpo e duas a de antijeno. Se por um lado verificámos antijeno em doente em que foi negativa a hemocultura, em dous outros em que foi pozitiva essa prova não revelou o ensaio a prezença do ajente da infeção.

Sobreleva entre as observações a primeira, que mais tempo ocupará nossa atenção. A presença do anticorpo de BORDET verificada no soro na auzencia de aglutininas, embora, seja fato digno de rejistro não constitue o lado mais interessante dessa observação.

HIRSCHFELD e NEUFELD em estudos anteriores tinham já assinalado a precocidade de formação do anticorpo de BORDET.

Não foi ainda o que nos chamou a atenção para esse cazo a prezença de antijeno no sangue cuja cultura rezultou esteril. A sensibilidade da reação constitue explicação suficiente d'este fato.

Acreditamos sumamente interessante essa observação pela prezença simultanea de antijeno e anticorpo verificada no soro de um mesmo doente e do qual não conhecemos em literatura outro exemplo.

A explicação, que pudemos encontrar para esse fato é a não corespondencia dos antijenos e anticorpos pesquizados. Outra explicação seria o estabelecimento de equilibrio quimico no qual além da combinação antijeno + anticorpo restaria livre uma certa quantidade desses elementos que teriam entrado em combinação por ocazião de nova adição de antijeno ou anticorpo, permitindo assim nova prisão de complemento.

A essa observação referem-se os quadros 1 e 2.

BORDET'sche Reaktion anwandte, bestehen aus 9 Typhus-, 38 Pest- und 3 Dysenterie-Fällen (letztere von bacillärer Form). Von den 9 Typhusinfektionen wurde bei vieren die Diagnose durch Kultur des Bacillus erwiesen, welcher einmal aus Fäces, ein anderes Mal aus dem Blute, ein drittes Mal aus Blut und Urin und endlich ein viertes Mal bei der Autopsie aus der Milz isolirt wurde. In 2 dieser 4 Fälle trug auch die WIDAL'sche Reaktion zur Bestätigung der Diagnose bei. In den übrigen 5 Beobachtungen wurde die klinische Diagnose durch positives Ausfallen der Agglutination bestätigt.

Sechsmal konstatirte ich das Vorkommen des Antikörpers und zweimal die Gegenwart von Antigen. Während ich bei einem Kranken, bei welchem die Hämokultur negativ blieb, Antigen nachwies, war diese in zwei anderen Fällen positiv, obwohl die Untersuchung die Gegenwart des Krankheitserregers nicht anzeigte; von diesen Beobachtungen fällt die erste besonders auf und soll unsere Aufmerksamkeit etwas länger beschäftigen. Der Nachweis des Vorkommens des Antikörpers von BORDET im Serum bei fehlendem Agglutinin ist zwar erwähnenswert, bildet jedoch nicht die interessanteste Seite der Beobachtung. HIRSCHFELD und NEUFELD hatten schon bei früheren Untersuchungen die frühzeitige Bildung des Antikörpers von BORDET angegeben. Auch die Gegenwart des Antigens im Blute, dessen Kultur steril blieb, fiel mir nicht besonders auf, da die Empfindlichkeit der Reaktion dies genügend erklärt. Was ich dagegen bei dieser Beobachtung für besonders interessant halte, ist das gleichzeitige Vorkommen von Antigen und Antikörper bei der Untersuchnng des Blutes von einem und demselben Patienten, wovon ich in der Litteratur kein anderes Beispiel kenne.

Die Erklärung dieser Tatsache kann man darin suchen, dass die gefundenen Antigene und Antikörper sich nicht entsprechen. Eine andere Erklärung wäre die Herstellung eines chemischen Gleichgewichtes, bei welchem neben der Verbindung Antigen + Antikörper eine gewisse Menge dieser Elemente frei bliebe, welche sich bei einem neuen Zusatze von Antigen oder Antikörper verbinden und so eine neue Komplementbindung ermöglichen können.

Quadro 1

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Soro antitifico de cabra, inativado	Soro de doente, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cabra	Soro de cabra × carneiro	Globulos de carneiro a 5 %	Rezultado
0,04	0,1	—	0,1	0,1	1 cc	—
»	0,06	—	»	»	»	—
»	0,04	—	»	»	»	—
»	0,02	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+ +
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,06	»	»	»	+ +
»	—	0,04	»	»	»	+ + +
»	—	0,02	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,08	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Quadro 2

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Extrato de bacilo tifico	Soro de doente, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cabra	Soro de cabra × carneiro	Globulos de carneiro a 5 %	Rezultado
0,1	0,1	—	0,1	»	»	—
»	0,06	—	»	»	»	—
»	0,04	—	»	»	»	—
»	0,02	—	»	»	»	+
»	0,01	—	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+ + +
»	—	0,06	»	»	»	+ + +
»	—	0,04	»	»	»	+ + +
»	—	0,02	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Auf diese Beobachtung beziehen sich die Tabellen 1 und 2.

Tafel 1 **2 Stunden auf 37°**

1 Stunde auf 37°						
Inaktivirtes antityphisches Ziegenserum	Inaktivirtes Krankenserum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Ziegenserum	Ziegen Hammelblutserum	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,04	0,1	—	0,1	0,1	1 cc	—
»	0,06	—	»	»	»	—
»	0,04	—	»	»	»	—
»	0,02	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+ +
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,06	»	»	»	+ +
»	—	0,04	»	»	»	+ + +
»	—	0,02	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,08	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Tafel 2 **2 Stunden auf 37°**

1 Stunde auf 37°						
Typhusbacillen-Extract	Inaktivirtes Krankenserum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Ziegenserum	Ziegen Hammelblutserum	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,1	0,1	—	0,1	0,1	1 cc	—
»	0,06	—	»	»	»	—
»	0,04	—	»	»	»	—
»	0,02	—	»	»	»	+
»	0,01	—	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+ + +
»	—	0,06	»	»	»	+ + +
»	—	0,04	»	»	»	+ + +
»	—	0,02	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Em 3 doentes do Hospicio Nacional de Alienados, cujo diagnostico clinico foi em um cazo confirmado pela cultura de fezes, que nos forneceram um bacilo dizenterico do tipo Shiga-Kruse e em dous outros pela aglutinação, aplicamos a reação de BORDET.

Empregando em um cazo uma emulsão de bacilos do tipo *Shiga-Kruse* foi positva a reação; nos dous outros utilizamos-nos de uma emulsão de bacilos do tipo *Flexner*, sendo em um cazo positivo e em outro negativa a reação.

Dada a pequena quantidade de sangue que pudemos colher não nos foi possivel verificar a questão controversa da especificidade dos anticorpos para cada qual dos escantilhões de bacilo dizenterico. Em trabalho cuidadozo por DOPTER publicado em 1905 é essa especificidade negada.

Ao diagnostico clinico da peste procurámos aplicar a reação que vimos estudando, aproveitando uma serie de cazos recolhidos ao Hospital de Izolamento de S. Sebastião.

Além dos primitivos estudos de BORDET que verificou no soro antipestozo de cavalo a prezença de sensibilizadora especifica só conhecemos neste assunto os trabalhos de STRONG que, em Manilha, lançou mão da fixação de complemento para avaliar do gráo de imunidade conferida pela vacina antipestoza e de G. FORNARIO que, no Instituto Pasteur de Paris, verificou a prezença de anticorpo no soro de cobaias vacinadas por via retal e em outros que tinham ingerido *per os* bacilos mortos pelo aquecimento a 60º. Esses anticorpos ainda eram pesquizaveis cinco mezes apoz a inoculação.

Em larga serie de 38 cazos clinicamente diagnosticados, dos quais 32 confirmados bacteriolojicamente duas vezes assinalámos a prezença de antijeno e 25 a de anticorpo. Em onze cazos foi negativa a reação. Nos dous doentes em que conseguimos pesquizar antijeno no soro a hemocultura nos deu a indicação de tratar-se de cazos de septicemia pestoza. Na pesquiza de anticorpos empregámos como antijeno a emulsão bacilar que serve para preparo da vacina antipestoza de

Ich versuchte die BORDET'sche Reaktion bei 3 Patienten der hiesigen Irrenanstalt, bei welchen die klinische Diagnose einmal durch Isolirung eines Dysenteriebacillus vom Typus SHIGA-KRUSE aus den Fäces und zweimal durch die Agglutination bestätigt wurde. In einem Falle erhielt ich ein positives Resultat der Reaktion bei Anwendung einer Emulsion von SHIGA-KRUSE'schen Bacillen; in den beiden anderen benutzte ich Bacillen vom Typus FLEXNER, wobei die Reaktion einmal positiv und das andere mal negativ ausfiel.

Bei der geringen Blutmenge, die ich entnehmen konnte, war es mir nicht möglich, die Streitfrage über die Specifität der Antikörper für die beiden Dysenteriebacillenformen zu unterscheiden. In einer sorgfältigen, im Jahre 1905 veröffentlichten Arbeit von DOPTER wird die Spezifität in Abrede gestellt.

Die von mir studirte Reaktion suchte ich auch auf die klinische Diagnose anzuwenden, wobei ich eine Serie von Fällen aus dem hiesigen Isolirhospital (S. Sebastião) benutzte.

Abgesehen von den ursprünglichen Untersuchungen von BORDET, welcher in antipestösem Pferdeserum die Gegenwart eines spezifischen Antikörpers nachwies, kenne ich über diesen Gegenstand die Arbeit von STRONG, der in Manilla die Komplementablenkung anwandte, um den durch die antipestöse Impfung bewirkten Immunitätsgrad festzustellen. Dazu kommt noch die Arbeit von FORNARIO aus dem «Institut Pasteur» in Paris, welcher den Antikörper im Blutserum von Meerschweinchen nachwies; letztere waren teils *per rectum* geimpft, teils hatten sie *per os* durch Erhitzung auf 60° abgetötete Bacillen aufgenommen. In einer Serie von 38 klinisch diagnostizirten Fällen, unter welchen 32 mit bakteriologischem Nachweis des Erregers, erkannte ich zweimal die Gegenwart von Antigen und 25 mal die des Antikörpers. In 11 Fällen war das Resultat der Reaktion ein negatives. Bei 2 Patienten, deren Serum Antigen erkennen liess, zeigte die Blutkultur, dass es sich um septikämische Pest handelte. Bei der Untersuchung auf Antikörper verwandte ich als Antigen die Bacillenemulsion, welche in Manguinhos zur Herstellung der antipes-

Manguinhos cujo preparo vem descrita em trabalho desse Instituto por A. Fontes em 1903.

Na maioria das observações retiramos sangue no 5.º dia de molestia; fornecerem alguns material no 8.º e 9.º dia de enfermidade. Cumpre assinalar, entretanto, quatro doentes que no terceiro dia de molestia nos deram rezultado pozitivo. Ainda assim não é dificil explicar esses rezultados para quem conhece o tempo de incubação da molestia que é na media de 3—5 dias. Este periodo póde variar dentro de grandes limites, desde algumas horas (peste fulminante) até cerca 5 a 15 dias.

Na impossibilidade de aqui reproduzir os quadros referentes a todas as observações daremos uma pesquiza de antijeno e outra de anticorpo, sendo essa de um doente no 7.º dia de molestia. (Quadros 3 e 4).

Quadro 3

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Soro antipestozo de cavalo, inativado	Soro de doente, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cobaia	Soro de cobaia × coelho	Globulos de coelho 5 %	Rezultado
0,2	0,2	—	0,15	0,01	1 cc	—
»	0,1	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	+
»	0,03	—	»	»	»	+ +
»	0,01	—	»	»	»	+ + +
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,2	»	»	»	+ +
»	—	0,1	»	»	»	+ + +
»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,4	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,4	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,4	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Tafel 3

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°						
Inaktivirtes antipestöses Pferdeserum	Inaktivirtes Krankenserum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Meerschweinchenserum	Meerschweinchen-Kaninchenblutserum	5 % Kaninchenblutkörperchen	Resultat
0,2	0,2	—	0,15	0,01	1 cc	—
»	0,1	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	+
»	0,03	—	»	»	»	+ +
»	0,01	—	»	»	»	+ + +
»	0,006	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,2	»	»	»	+ +
»	—	0,1	»	»	»	+ + +
»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0.03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,4	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,4	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,4	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

tösen Vaccine dient, wie sie 1903 in einer Arbeit dieses Institutes von A. FONTES beschrieben wurde. In der Mehrzahl der Beobachtungen entnahm ich das Blut am fünften Krankheitstage, bei einigen anderen stammte das Material vom achten bis neunten Tage der Erkrankung; doch müssen auch 4 Patienten erwähnt werden, welche am dritten Krankheitstage mit positivem Resultate untersucht wurden. Im übrigen sind diese Ergebnisse nicht schwer zu verstehen, wenn man die Incubation der Krankheit, im Mittel 3 bis 5 Tage, berücksichtigt. Letztere Periode schwankt innerhalb weiter Grenzen, von einigen Stunden (bei fulminirenden Fällen), bis zu einer Frist von 5 bis 15 Tagen. Da es mir nicht möglich ist, die auf sämtliche Beobachtungen bezüglichen Tabellen zu reproduziren, gebe ich eine Untersuchung auf Antigen und eine auf Antikörper wieder, wobei die letztere von einem Patienten am 7. Krankheitstage stammt. (Tabellen 3 und 4).

Quadro 4

2 horas a 37°

1 hora a 37°

Emulsão de bacilos da peste mortos pelo calor	Soro de doente, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cobaia	Soro de cobaia × coelho	Globulos de coelho 5 %	Rezultado
0,02 mg	0,1	—	0,1	0,01	1 cc	—
»	0,08	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,03	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,08	»	»	»	+
»	—	0,05	»	»	»	+ +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,04 mg	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Tafel 4

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°

Durch Hitze getötete Pestbacillen Emulsion	Inaktivirtes Krankenserum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Meerschweinchenserum	Meerschweinchen-Kaninchenblutserum	5 % Kaninchenblutkörperchen	Resultat
0,02 mg	0,1	—	0,1	0,01	1 cc	—
»	0,08	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,03	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,08	»	»	»	+
»	—	0,05	»	»	»	+ +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,04 mg	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Não nos iludimos quanto á aplicação clinica da fixação de complemento em qualquer das 3 infeções estudadas. A complexa tecnica do metodo biolojico de que se trata não permitirá, sem duvida, que ella venha, por ora, substituir a hemocultura e a prova de WIDAL.

Abandonando as infeções bacterianas interessou-nos estudar a aplicação que poderia ter essa nova aquizição dos modernos estudos de imunidade em infeções cauzadas por espiroquetas e clamidozoarios.

Em vasto numero de cazos de sifilis, paralizia geral e tabes verificámos a reação de WASSERMANN. Não se tratando nessa infeção de pesquiza de anticorpo e sim de reação quimica de natureza ainda não desvendada não nos deteremos aqui no estudo do assunto.

Melhor campo nos oferecia, sem duvida, a espiroquetose das galinhas onde, ao contrario do que se observa na sifilis, o virus existe em abundancia no sangue.

Datam de 1908 os estudos de MANTEUFEL; até então só eram conhecidos no soro de ga-

Ueber die klinische Verwendbarkeit der Komplementablenkung bei den 3 verschiedenen von mir studirten Infektionen mache ich mir keine Illusionen. Die komplizirte Technik der betreffenden biologischen Methoden wird sicherlich nicht gestatten, dass sie zur Zeit die Blutkultur und den WIDAL'schen Versuch ersetzen könnten.

Abgesehen von Bakterieninfektionen, schien mir von Interesse zu untersuchen, inwiefern sich diese neue Errungenschaft der Immunitätsstudien auch bei den durch Spirochäten und Chlamydozoen hervorgerufenen Infektionen anwenden liesse.

Ich habe die WASSERMANN'sche Reaktion bei sehr zahlreichen Fällen von Syphilis, allgemeiner Paralyse und Tabes untersucht. Da es sich dabei nicht um den Nachweis eines Antikörpers, sondern um eine, in ihrer Natur noch nicht erklärte, chemische Reaktion handelt, will ich mich hier nicht mit dem Studium dieses Gegenstandes aufhalten.

Ein besseres Beobachtungsfeld dürfte zweifellos die Spirochätose der Hühner bieten,

linhas imunes: aglutininas e anticorpos paraziticidas.

MANTEUFEL empregou como antijeno sangue seco pulverizado em suspensão em solução fiziolojica, extratos de orgãos e de sangue de galinhas varias vezes inoculadas com espiroquetas. Verificou assim a prezença de anticorpos especificos no soro de galinhas imunes em todas as experiencias em que trabalhava com extrato sanguineo.

Encetando os estudos sobre antijeno e anticorpo na espiroquetoze das galinhas preparámos o imunisoro como o fizera MANTEUFEL, fazendo repetidas inoculações de sangue rico em espiroquetas em galinhas que tinham rezistido á infeção experimental; diverjimos, entretanto, desse pesquizador no modo de preparar o antijeno.

Substituimos o extrato sanguineo pelo soro de galinha no 3.º ou 4.º dia de infeção, ocazião em que aumenta o numero de espiroquetas na circulação geral.

Inativamos o imunisoro e o soro de galinha infetada e assim conseguimos pesquizar antijeno no soro emquanto o exame microscopico revelava a presença do microorganismo no sangue.

Ao dezaparecer o germen da circulação periferica tornou-se possivel a pesquiza de anticorpos que, então, se mantem no soro durante largo espaço de tempo. (Quadros 5 e 6).

Entre as infeções cauzadas por clamidozoarios ocuparam nossa atenção as infeções vacinica, variolica, rabica, tracomatoza, o epitioma contajiozo dos pombos e a peste das galinhas.

Compreendendo o grande alcance que poderá ter para a imunidade conferida pela vacida, assim como para o diagnostico da variola, com grande empenho pesquizámos nessas duas infeções a formação de anticorpos.

Na vacina como na variola é questão de não pequena importancia a da circulação do virus no organismo. Longamente debatida ainda não concordaram sobre esse assunto os pesquizadores. Admitida por PFEIFFER, REITER, FROSCH, FREYER, SIEGEL, v. WASIELEWSKI e

bei welcher im Gegensatze zur Syphilis das Virus reichlich im Blute gefunden wird. Bis zu den Studien von MANTEUFEL (1908) kannte man im Serum der immunisirten Hühner nur Agglutinine und parasitizide Antikörper. MANTEUFEL verwandte als Antigen getrocknetes, zerriebenes und in physiologischer Salzlösung suspendirtes Blut, ausserdem Extrakte aus den Organen und dem Blute von Hühnern, die mehrmals mit Spirochäten geimpft waren. Auf diese Weise konstatirte er die Gegenwart von spezifischen Antikörpern im Blute von immunisirten Hühnern bei allen Versuchen, in welchen Blutextrakt angewandt wurde. Bei meinen Versuchen über Antigene und Antikörper bei Spirochätose der Hühner stellte ich das Immunserum auf dieselbe Weise her, indem ich wiederholt an Spirochäten reiches Blut auf Hühner verimpfte, welche der experimentellen Infektion widerstanden hatten; dagegen wich ich von MANTEUFEL bei der Herstellung des Antigens ab. Ich ersetzte nähmlich das Blutextrakt durch Hühnerserum vom dritten und vierten Infektionstage, an welchen die Zahl der Spirochäten in zirkulirendem Blute zunimmt. Ich inaktivirte das Immunserum und das Serum von infizirten Hühnern und es gelang mir so, Antigen im Serum nachzuweisen, solange die mikroskopische Untersuchung die Gegenwart der Parasiten im Blute ergab. Nach Verschwinden derselben aus der peripherischen Circulation war es möglich, die Antikörper nachzuweisen, welche sich dann während langer Zeiträume im Serum erhalten. (Tabellen 5 und 6).

Von den Infektionen durch Chlamydozoen dienten mir zur Untersuchung Vaccine, Variola, Hydrophobie, Trachom, Epithelioma contagiosum der Tauben und Hühnerpest.

In Berücksichtigung der grossen Bedeutung, welche die Bildung der Antikörper für die Vaccinimmunität und die Diagnose der Pocken haben könnte, forschte ich bei beiden Infektionen sehr eifrig nach derselben.

Bei der Vaccine und Variola ist die Frage der Circulation des Virus im Organismus von nicht geringer Bedeutung. Trotz langer Debatte haben sich die Forscher auf diesem Gebiete noch nicht geeinigt. Während die-

Quadro 5

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Imunisoro	Soro de galinha infetada (3.o dia de infeção)	Soro de galinha normal	Complemento: soro de cobaia 1:10	Soro de coelho × carneiro 1:100	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,1	0,1	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,03	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+ +
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	+ + +
—	—	—	—	—	»	—

Tafel 5

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°						
Immunserum	Infizirtes Hühnerserum (3. Tag nach der Infektion)	Normales Hühnerserum	Komplement: Meerschweinchenserum 1:10	Kaninchen-Hammelblutserum 1:100	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,1	0,1	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,03	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+ +
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0.005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	—	»	—

Quadro 6

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Soro de galinha doente (3.o dia de infeção)	Soro de galinha (2 dias depois da crize)	Soro de galinha normal	Complemento: soro de cobaia 1:10	Soro de coelho × carneiro 1:100	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,1	0,1	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,03	—	»	—	—	+ + +
»	0,01	—	»	—	—	+ + +
»	0,005	—	»	—	—	+ + +
»	—	0,1	»	—	—	+ +
»	—	0,05	»	—	—	+ +
»	—	0,03	»	—	—	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	—	»	—

Tafel 6

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°						
Krankes Hühnerserum (3. Infektionstag)	Hühnerserum (2 Tage nach der Krisis)	Normales Hühnerserum	Komplement: Meerschweinchenserum 1:10	Kaninchen-Hammelblutserum 1:100	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,1	0,1	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,03	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	—	—	+ + +
»	0,01	—	»	—	—	+ + +
»	0,005	—	»	—	—	+ + +
»	—	0,1	»	—	—	+ +
»	—	0,03	»	—	—	+ +
»	—	0,05	»	—	—	+ + +
»	—	0,01	»	—	—	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	—	»	—

ALDERSHOFF que registram a formação de pustulas vacinicas em creanças vacinadas com sangue e extrato organico de vitelos imunizados é ella negada por CALMETTE e GUERIN, v. PROWAZEK, PASCHEN, HAALAND, HAUSER, JÜRGENS, MÜHLENS, e HARTMANN, NOBL, HALBERSTAEDTER e ZÜPFLE.

Si na vacina ainda existem duvidas a este respeito, na variola duvida não pode haver sobre a pasajem do virus na circulação geral.

Parece, entretanto, que é em quantidade relativamente pequena que o virus variolico passa no sangue, depozitando-se rapidamente nas celulas. Nem outra concluzão se poderá tirar do grande numero de vacinações negativas em dorso e cornea de coelho com sangue e extrato de baço, rim e figado de doentes falecidos de variola hemorajica e confluente. (v. PROWAZEK e H. ARAGÃO).

Na vacina JOBLING e CASAGRANDI registram rezultados positivos e HELLER TOMARKIN e BERMBACH rezultados negativos nos ensaios de fixação de complemento.

Merecem especial menção os recentes estudos de BERMBACH que alem dos ensaios em cobaias e coelhos vacinados e submetidos a inoculações subcutaneas de linfa glicerinada tambem se ocupou da pesquiza *in anima nobili*. Em 18 individuos vacinados e revacinados nem uma vez revelou no soro a prezença de anticorpos para virus vacinico. Não se limitou esse autor a pesquizar no soro o produto de reação especifica, estendeu aos extratos splenico e hepatico seu campo de ação.

Em coelhos e em um vitelo fizemos nossos estudos. Foram os coelhos tres vezes inoculados com 1 cc de linfa glicerinada colhida de vitelo vacinado no Instituto de Manguinhos. As inoculações eram separadas por intervalos de sete dias e, oito dias apoz a ultima inoculação, procedemos á sangria.

Quanto ao vitelo depois de imunizado fizemos uma inoculação por via subcutanea de linfa colhida no quinto dia e 3 outras intravenosas de 1, 3 e 4 cc de linfa glicerinada. Oito dias apoz a ultima inoculação sangramos o animal na veia jugular.

selbe von PFEIFFER, REITER, FROSCH, FREYER, SIEGEL, v. WASIELEWSKI und ALDERSHOFF zugegeben wird (unter Anführung der Bildung von Vaccinepusteln bei Kindern, die mit Blut und Organextrakt von immunisirten Kälbern geimpft waren), wird dieselbe von CALMETTE und GUÉRIN, v. PROWAZEK, PASCHEN, HAALAND, HAUSER, JÜRGENS, MÜHLENS und HARTMANN, NOBL, HALBERSTÄDTER und ZÜPFLE verneint. Wenn hierüber bei der Vaccine noch Zweifel herrschen, so kann bei der Variola das Vorkommen des Virus in der allgemeinen Circulation nicht bezweifelt werden.

Es scheint jedoch, dass das Variolavirus in verhältnismässig kleiner Menge ins Blut übertritt und sich rasch in den Zellen ablagert. Die zahlreichen negativen Impfungen auf Rücken und Cornea des Kaninchens mit Blut, sowie mit Milz- und Leberextrakt von an hämorrhagischer und confluirender Variola Gestorbenen (v. PROWAZEK und H. ARAGÃO) gestatten keinen anderen Schluss.

Bei Versuchen über Komplementablenkung geben JOBLING und CASAGRANDI positive, HELLER, TOMARKIN und BERMBACH negative Resultate an. Besondere Erwähnung verdienen die neuerdings gemachten Studien von BERMBACH, welcher ausser Versuchen mit Meerschweinchen und Kaninchen, die nach der Impfung mit subkutanen Injektionen von Glycerinlymphe behandelt wurden, auch Untersuchungen *in anima nobili* vornahm. Bei 18 Geimpften und Revaccinirten endeckte er auch nicht einmal im Serum Antikörper gegen das Vaccinevirus. Auch beschränkte dieser Autor sich nicht auf das Aufsuchen des spezifischen Reaktionsproduktes im Serum, sondern zog auch Milz- und Leberextract in das Gebiet seiner Forschungen.

Ich machte meine Studien bei Kaninchen und einen Kalbe. Erstere wurden dreimal mit Glycerinlymphe geimpft, welche von einem im Institut von Manguinhos geimpften Kalbe herrührte. Die einzelnen Impfungen waren durch einen Zeitraum von 7 Tagen getrennt und 8 Tage nach der letzten fand die Blutentnahme statt.

Beim Kalbe machte ich nach der Immunisirung eine subkutane Einspritzung von Lymphe

Para preparo do antijeno empregámos a seguinte tecnica: em gral de porcelana trituramos durante 20-30 minutos linfa recente; depois de 10-12 horas de ajitação levamol-a a centrifugo de grande velocidade; desse modo obtivemos um liquido claro sem corpusculo em suspensão e que devia conter virus vacinico.

Em todos os ensaios, quer fosse o complemente de cobaia, coelho, cabra ou vitelo, foram negativos os rezultados.

Não foram outros os rezultados colhidos na variola. Ao contrario de CASAGRANDI, BEINTKER e SUGAI que assinalaram no soro de variolozos anticorpos para virus da vacina e para o da variola não chegámos na maioria dos cazos a essa concluzão. Em cazos de variola e varicela registra NICOLAU BETTENCOURT a impossibilidade de pesquizar pela reação de BORDET, anticorpos especificos.

Procurámos variar o mais possivel as condições de experiencia, empregando como antijeno o liquido claro retirado da vesicula de um doente de variola confluente no 3.º dia de molestia, soro de um doente de variola hemorajica no segundo dia de enfermidade, conteudo de pustulas variolozas em dias diferentes de evolução clinica, ora filtrado em papel grosso, ora em vela BERKEFELD, extrato de figado de variolozo da forma confluente e hemorajica e do baço de um variolozo da forma gangrenoza.

Para esses antijenos procurámos anticorpos no soro de coelhos inoculados com vacina, puz de variolozo, extrato de baço e em soro de variolozos no 11.º, 12.º, 14.º, 15.º, 17.º, 20.º, 25.º e 40.º dia de molestia.

Empregámos, como já o fizemos, na infeção vacinica complementos de soros diversos (cobaia, coelho, cabra e vitelo) porque atenta a pluralidade de complementos poder-se ia explicar pela falta de um complemento que se adaptase ao anticorpo o rezultado negativo da experiencia.

Do quadro n.º 7 é facil verificar que só em um cazo para o qual nenhuma explicação aventamos o soro de um doente no 18.º dia

vom 5. Tage und drei andere intravenöse von 1,3 und 4 ccm. Glycerinlymphe. Acht Tage nach der letzten Impfung machte ich bei dem Tiere einen Aderlass an der Jugularis.

Zur Herstellung des Antigens diente folgende Technik: In einer Reibschale wurde während 20 bis 30 Minuten frische Glycerinlymphe zerrieben; nach 10 bis 12-stündigem Schütteln wurde dieselbe auf eine Centrifuge von grosser Umlaufsgeschwindigkeit gebracht und auf diese Weise eine klare Flüssigkeit ohne suspendirte Partikel gewonnen, welche das Vaccinevirus enthalten musste. Bei allen Versuchen waren die Resultate negativ, sei es nun, dass das Komplement von Meerschweinchen, Kaninchen, Ziegen oder Kälbern herrührte.

Auch bei der Variola erhielt ich dasselbe Resultat. Im Gegensatz zu CASAGRANDI, BEINTKER und SUGAI, welche im Serum von Pockenkranken Antikörper für Vaccine- und Variolavirus fanden, kam ich in der Mehrzahl der Fälle zu einem negativen Resultate. Bei Variola- und Varizella-Fällen konstatirte NICOLAU BETTENCOURT die Unmöglichkeit, spezifische Körper durch die BORDET'sche Reaktion nachzuweisen.

Ich versuchte die Bedingungen der Experimente möglichst mannigfaltig zu gestalten, indem ich als Antigen die, aus einem Bläschen eines Kranken mit confluirender Variola am 3. Krankheitstage entnommene, klare Flüssigkeit, das Blutserum eines Falles von Variola hämorrhagica am 2. Krankheitstage oder den Inhalt von Pockenpusteln (an verschiedenen Krankheitstagen entnommen und durch dickes Filtrirpapier oder BERKEFELD-Filter filtrirt) anwandte, ferner Leberextrakt von Fällen der confluirenden und hämorrhagischen Form und Milzextrakt von gangraenösen Pocken.

Für diese Antigene suchte ich Antikörper im Serum von Kaninchen, die mit Vaccine, Variola-Eiter, Milzextrakt geimpft waren, und im Serum von Pockenkranken am 11., 12., 14., 15., 17., 20., 25. und 40. Krankheitstage.

Wie schon bei der Vaccineinfektion verwandte ich Komplemente verschiedener Sera (von Meerschweinchen, Kaninchen, Kälbern und von Ziegen), weil man, in Hinsicht auf

de molestia impedia hemolise quando em prezença de puz variolozo.

V. PROWAZEK e ARAGÃO, que na mesma conjuntura estudaram a ação paralizante que sobre o virus vacinico excercia o soro do variolozo não a assinalaram nesse caso, registrando-a, entretanto, no soro de um doente no 21.º dia de molestia.

De estudos serolojicos anteriormente realizados: pesquiza de lisinas e antitoxinas (HUGUENIN e v. PIRQUET) assim como da serie de fatos acima relatados licito é concluir que não é o soro e sim a celula o depositario da imunidade duradoura conferida pela vacina.

Quadro 7

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Pus variolozo filtrado em papel	Soro de variolozo, 18.º dia, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cobaia 1:10	Soro de coelho × carneiro 1:100	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,1	0,1	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+ +
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+ + +
»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Na vacinação cutanea ao contrario do que se dá na cornea do coelho a imunidade se estende a todas as celulas do envolucro epitelial. O desprendimento dos imunicorpos, a subsequente pasajem no sangue e fixação nas celulas visceraes encontra evidente contestação nos trabalhos de BERMBACH acima citados.

Na infeção rabica, no trachoma, no epitelioma dos pombos e na peste das galinhas manifestava se sempre hemolize total.

die Pluralität der Komplemente, das negative Versuchsresultat aus dem Fehlen eines Komplementes erklären konnte, welches sich mit dem Zwischenkörper verbinden könnte.

Aus Tabelle N.º 7 ersieht man ohne Schwierigkeit, dass nur in einem Falle, für den ich keine Erklärung bieten kann, das Blutserum eines am 18. Krankheitstage stehenden Patienten in Gegenwart von Variola-Eiter die Hämolyse verhinderte.

V. PROWAZEK und ARAGÃO, die zur selben Zeit den hemmenden Einfluss des Serums Pockenkranker auf Vaccinevirus studirten, vermissten ihn bei diesem Falle, fanden ihn dagegen in einem Serum vom 21. Krankheitstage. Aus früher gemachten serologischen Studien: Untersuchungen auf Lysine und Antitoxine (HÜGUENIN und v. PIRQUET) ebenso, wie aus der oben berichteten Reihe von Beobachtungen, kann man schliessen, dass es nicht das Serum, sondern die Zelle ist, in welcher die, durch die Vaccine erworbene, dauernde Immunität, enthalten ist.

Tafel 7

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°						
Durch Papier filtrirter variolöser Eiter	18 Tage inaktivirtes variolöses Serum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Meerschweinchenserum 1:10	Kaninchen-Hammelblutserum 1:100	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,1	0,1	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+ +
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+ +
»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	»	»	—
—	—	—	—	—	·	—

Im Gegensatz zu den Beobachtungen an der Kaninchencornea, estreckt sich bei der kutanen Impfung die Immunität auf alle Zellen

Na raiva concordam os experimentadores na impossibilidade de, pela fixação de complemento, surpreender a formação de anticorpos. São negativos os trabalhos de HELLER e TOMARKIN, FRIEDBERGER, v. BARONI, M. CINCA e C. TONESCA, MIHAESTI, SATTA e DONATI.

Empregando como antijeno emulsão de cortex cerebral de coelho (virus das ruas) triturado em gral e centrifugado apoz forte agitação procuramos verificar a formação de produtos de reação especifica em coelho quatro vezes inoculado com uma emulsão aquecida a 40° durante 15′ de cortex e bulbo de boi rabido e em um coelho experimentalmente infetado que morreu em sete dias. Entre as inoculações mediaram cinco dias e entre a sangria e a ultima inoculação uma semana.

Na peste das galinhas acreditamos serem nossos os primeiros ensaios de fixação de complemento.

A centrifugação demorada de emulsão cerebral de galinha infetada fornecia-nos antijeno para os estudos. Devido á exajerada sensibilidade das galinhas ao virus ativo aquecemol-o a 55° durante 15′, diminuindo assim a virulencia e permitindo mais de uma inoculação.

Em virtude da rezistencia de pombos a repetidas inoculações de elevadas dozes de virus prestava-se este animal ás experiencias que tinhamos em vista fazer.

Como acima foi repetido, foram ainda na peste de galinhas negativos os rezultados.

Em pombos espontanea e experimentalmente infetados com epitelioma contagiosum inoculámos uma suspensão em solução fiziolojica de crostas pulverizadas de epitelioma e servindo como antijeno essa emulsão pesquizámos com rezultado negativo anticorpo no soro dos pombos.

No tracoma limitaram-se a tres doentes nossas verificações.

Constava o antijeno de secreção seca e pulverizada em suspensão em solução fiziolojica.

der Epithelialdecke. Die Entbindung der Immunkörper und der nachfolgende Uebergang ins Blut, sowie die Fixirung in den Visceralzellen wird durch die oben citirten Arbeiten von BERMBACH widerlegt.

Bei der Hydrophobie, dem Trachom, dem Epiteliom der Tauben und der Hühnerpest ergab sich immer eine totale Hämolyse. Bei der Wut stimmen die Untersucher darin überein, dass es unmöglich ist, durch Komplementablenkung die Bildung von Antikörpern zu entdecken. Die Arbeiten von HELLER und TOMARKIN, FRIEDBERGER, v. BARONI, M. CINCA und C. TONESCA, MIHAESTI und SATTA und DONATI ergaben ein negatives Resultat.

Indem ich als Antigen eine Emulsion der Hirnrinde des Kaninchen (Strassenvirus), zerrieben und nach starkem Schütteln centrifugirt, verwendete, suchte ich die Bildung von Reaktionsprodukten bei Kaninchen zu konstatiren, welche viermal mit einer 15 Minuten lang auf 40° erwärmten Rindenemulsion und dem Bulbus eines tollen Rindes geimpft waren, ausserdem bei einem experimentell infizirten Kaninchen, das am 7. Tage starb. Von einer Impfung zur anderen wartete ich 5 Tage und von der letzten bis zur Blutentnahme eine Woche.

Bei der Hühnerpest glaube ich, dass meine Versuche über Komplementablenkung die ersten sind. Die langdauernde Centrifugirung der Hirnemulsion eines infizirten Huhnes lieferte das Antigen zu meinen Versuchen. Wegen der ausserordentlichen Empfindlichkeit der Hühner für das aktive Virus erhitzte ich dasselbe während 15 Minuten auf 55°, wodurch die Virulenz herabgesetzt und eine wiederholte Impfung ermöglicht wurde.

In Folge ihrer Resistenz gegen wiederholte Einimpfung grosser Virusmengen eigneten sich die Tauben für die Versuche, die ich beabsichtigte. Wie schon oben erwähnt, waren auch bei der Hühnerpest die Resultate negativ.

Bei, spontan und experimentell, mit Epithelioma contagiosum infizirten Tauben, injizirte ich eine Suspension von pulverisirten Epitheliomkrusten in physiologischer Lösung und gebrauchte als Antigen dieselbe Emulsion; die Untersuchung auf Antikörper im Serum der Tauben ergab ein negatives Resultat.

Como em trabalhos anteriores verificára RÖMER não se observa no tracoma impedimento algum de hemolize.

Recentes estudos de MARONGUI no Instituto de Hijiene de Cagliari contem a afirmação de que no soro tracomatozo existe uma sensibilizadora especifica de modo que a hemolize que se manifesta em presença do bacilo de KOCH-WEECKS e do de MÜLLER não se manifesta em prezença do virus do tracoma. A esse ponto pretendemos ainda voltar quando dispuzermos de maior material.

Bei Trachom beschränkten sich meine Untersuchungen auf drei Patienten. Das Antigen bestand in getrocknetem und pulverisirtem Sekrete, welches in physiologischer Lösung suspendirt wurde. Wie schon RÖMER in früheren Arbeiten feststellte, beobachtet man bei Trachom keine Behinderung der Hämolyse.

Neuere Studien von MARONGUI im Instituto di Igiene di Cagliari enthalten die Angaben, dass im trachomatösen Serum ein spezifischer Antikörper existirt, sodass bei Gegenwart des Trachomvirus die Hämolyse nicht stattfindet, welche bei Vorhandensein der Bazillen von KOCH-WEEKS und MÜLLER erfolgt. Auf diesen Punkt gedenke ich noch zurückzukommen, sobald ich über mehr Material verfüge.

Contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Simulium"

pelo

Dr. Adolpho Lutz

Beitrag zur Kenntniss der brasilianischen Simuliumarten

von

Dr. Adolph Lutz.

Aos dipteros chupadores de sangue, além de outros grupos geralmente conhecidos, pertencem tambem as especies do genero *Simulium*, chamadas *borrachudos* nos Estados do Rio de Janeiro e S. Paulo e *Piúm* no Norte do Brazil; em muitos lugares estes dipteros impõem-se á atenção geral pelo seu grande numero e suas picadas dolorozas.

As especies de *Simulium* geralmente são de tamanho pequeno e na sua aparencia exterior são mais parecidas a pequenas moscas que a mosquitos tipicos, como os culícidas; são, todavia, mais proximos dos ultimos, por cauza das antenas multiarticulares e, como, tambem, fica provado, pelo estudo de seus estados anteriores. Estes são encontrados sómente em agua bastante ajitada; em consequencia disso os simúlidas são muito menos geralmente espalhados que a maior parte dos outros dipteros sanguesugas, porque em terrenos planos são naturalmente mais raros ou faltam completamente. Tambem o numero das especies conhecidas é menor que o dos culícidas e tabánidas, não obstante sua vasta distribuição geografica. Na Europa, SCHINER enumera 29 especies; OSTEN-SACKEN, nos Estados Unidos, 5 especies. Este numero elevou-se, depois, a 15 especies bem diferenciadas. O mesmo autor cita 4 especias do Mexico e uma de Cuba; PHILIPPI descreve 7

Zu den blutsaugenden Zweiflüglern gehören neben anderen, allgemein bekannten Gruppen auch die Arten des Genus *Simulium*, die in den Staaten Rio de Janeiro und São Paulo als «*borrachudos*» und im Norden als «*piúm*» bezeichnet werden und sich vielerorts der Aufmerksamkeit des Publikums durch ihr zahlreiches Auftreten und ihre schmerzhaften Stiche geradezu aufdrängen. (Der deutsche Name wird gewöhnlich als «*Kriebelmücken*» angegeben, erfreut sich aber, wie das Insect selbst, einer weit geringeren Bekanntheit).

Die *Simuliumarten* haben durchwegs nur eine geringe Grösse und gleichen in ihrer äusseren Erscheinung mehr kleinen Fliegen, als Stechmücken, trotzdem sie wegen ihrer vielgliedrigen Fühler den letzteren näher stehen, wie auch aus der Betrachtung ihrer ersten Stadien ohne weiteres hervorgeht. Diese werden nur in stark bewegtem Wasser gefunden und in Folge dessen ist die Verbreitung der Simulien eine viel weniger allgemeine, als diejenige der meisten anderen blutsaugenden Zweiflügler, indem sie in flachen Gegenden natürlicherweise seltener sind und häufig ganz fehlen. Auch die Zahl der bekannten Species ist eine weit geringere, als bei den Culiciden und Tabaniden, obgleich ihre geographische Verbreitung eine weite ist. In Europa zählt SCHINER 29 Arten auf; in den Vereinigten Staaten

especies chilenas, BLANCHARD 1 e BIGOT 2 da Patagonia, emquanto do Brazil só ha 4 conhecidas. Em geral, os simúlidas são pouco estudados e, além das especies descritas, frequentemente pouco distintas, ha, sem duvida, muitas outras que escaparam á atenção, em parte, por não incomodar tanto o homem.

As especies conhecidas de *Simulium* têm, em geral, tipo bastante uniforme e, por isso, são facilmente reconhecidas. Além do tamanho e da côr geral, são principalmente a côr e o dezenho do escudo e das pernas que permitem diferenciação, nem sempre facil; as larvas pouco se distinguem, emquanto que nas ninfas a ramificação dos sifões respiratorios oferece, muitas vezes, carater anatomico de grande valor. O modo de viver, geralmente parece muito semelhante, como rezulta da comparação das observações feitas na America do Norte com as minhas, das quais em seguida dou breve descrição.

Para a postura dos ovos as femeas preferem pequenos corregos com bastante queda e procuram os logares onde estes formam cachoeiras, nas quais se acham plantas herbaceas, folhas secas, raizes ou galhos finos; nestes os ovos são depozitados imediatamente acima do nivel da agua, de modo que, na primeira enchente fiquem banhados, permitindo que as larvas saidas entrem na agua. Na America do Norte a postura dos ovos foi observada nas proprias pedras, onde, tambem, se encontravam as larvas; mas, entre nós, as cachoeiras, onde ha sómente pedras, nunca contêm maior numero de larvas.

As larvas, em geral, são cilindricas e um pouco achatadas em sentido dorso-ventral; a parte posterior é mais ou menos entumecida, em fórma de clava, e munida de orgam de adezão terminal; outro orgam semelhante encontra-se num processo em fórma de pé truncado situado na metade cefalica da face ventral; por meio destes orgãos a larva póde caminhar ao modo das lagartas *geometridas*. Além disso póde formar fio de seda e por estes meios sabe alcançar qualquer lugar, não obstante a mais forte correnteza. Chegada ao

waren nach OSTEN-SACKEN 5 gute Species bekannt, doch hat sich die Zahl der sicher verschiedenen Arten neuerdings auf 15 vermehrt. Weitere 4 Arten führt der letztere Autor aus Mexico und eine fünfte aus Cuba an; PHILIPPI beschreibt 7 Arten aus Chile, BLANCHARD 1 und BIGOT deren 2 aus Patagonien, während aus Brasilien erst 4 bekannt geworden sind. Im Ganzen sind die Simuliden wenig studirt und, ausser den — oft nicht leicht auseinanderzuhaltenden — beschriebenen Species, giebt es zweifellos noch viele andere, die zum Teil deswegen der Aufmerksamkeit entgangen sind, weil sie dem Menschen weniger lästig fallen.

Die bekannten Simuliumarten tragen im Ganzen ein ziemlich einheitliches Gepräge und sind daher leicht zu erkennen. Ausser der Grösse und Gesamtfärbung ist es besonders die Färbung und Zeichnung des Brustschildes und der Beine, welche eine — nicht immer leichte — Unterscheidung gestattet; die Larven sehen sich ziemlich gleich, während bei den Nymphen die Verzweigung der Athmungsröhren in vielen Fällen einen sehr wertvollen anatomischen Character darbietet. Die Lebensweise scheint durchwegs eine sehr ähnliche zu sein, wie aus der Vergleichung meiner hiesigen Beobachtungen mit den in Nordamerika gemachten hervorgeht, und soll in Folgendem kurz characterisirt werden.

Zur Eierablage bevorzugen die Weibchen Bäche mit starkem Gefälle und suchen die Stellen auf, wo dieselben kleine Wasserfälle bilden, in und um welche sich grüne Blätter, Gras, Wurzeln und Zweige finden, auf welchen die Eierablage dicht über dem Wasserspiegel stattfindet, sodass sie beim nächsten Ansteigen desselben benetzt werden und die ausschlüpfenden Larven ins Wasser gelangen können.

Die Larven sind im Ganzen cylindrisch und etwas dorsoventral abgeflacht, doch ist das Hinterende mehr oder weniger keulenförmig und überdies am Ende mit einem Haftorgan ausgestattet; ein zweites ähnliches findet sich auf einem stummelfussartigen Fortsatze der Ventralfläche, wodurch es der Larve ermöglicht wird, sich nach Art der Spannerraupen fortzubewegen. Ausserdem ist dieselbe im Stande, einen Faden zu spinnen und kann

lugar de escolha ella se fixa com a ventoza terminal, ficando frequentemente todo corpo em vibração continua. Na extremidade cefalica ha dous pentes de cerdas em forma de leque que pódem ser dobrados e em parte retraidos; sua função parece consistir em levar os alimentos á boca. Nas aguas geralmente claras estes alimentos não são muito abundantes e, por isso, provavelmente, quazi tudo o que se oferece é aproveitado, quer dizer, além de detritos animais e vejetais, principalmente pequenos organismos, tanto plantas como animais, por exemplo, diatomaceas, algas, principalmente unicelulares, e protozoarios. As duas primeiras encontrámos no conteúdo intestinal.

Observam-se duas antenas e duas manchas de pigmento em forma de olhos rudimentares situadas sobre a capsula cefalica quitinoza e um orgam em forma de apendice branquial, na extremidade posterior. A pele é liza e bastante transparente, de modo que antes da formação do cazulo, já se pódem reconhecer os futuros apendices traqueais da ninfa, formando mancha preta distinta debaixo da pele da larva. A côr geral desta é esverdeada ou pardo-olivacea o que, em parte, depende da alimentação. As larvas são geralmente encontradas, em maior numero, e pódem ser facilmente creadas, com a condição de se observar certas precauções; assim obtem-se tambem os machos que conhecemos de trez das nossas especies, e que, além dos carateres sexuais distinguem-se pelas dimensões menores e pelos olhos confluentes, tendo pelo lado de cima facetas maiores. Como os machos não chupam sangue e por isso não procuram o homem, não são facilmente obtidos; apenas pódem ser encontrados, ás vezes, nas vidraças das janelas, principalmente, quando são acarretados por vento constante dos seus creadouros, muitas vezes bastante distantes.

Para transformar-se, as larvas tecem um cazulo conico um pouco achatado e aberto em cima, em forma de cartucho de papel, no qual a ninfa (que tem forma correspondente) se acha como implantada, saindo apenas os

mittelst dieser Hilfsmittel auch in der stärksten Strömung jeden Platz erreichen; am Orte der Wahl fixirt sie sich mit dem terminalen Saugnapfe, wobei häufig der Körper beständig vibrirt. Am Kopfende finden sich zwei Borstenkämme, welche fächerartig gefaltet und teilweise eingezogen werden können und mit deren Hilfe die Nahrung der Mundöffnung zugeführt wird. Erstere ist in solchen, gewöhnlich klaren, Gewässern nicht überreichlich und es wird daher wohl nahezu Alles verwendet, was sich bietet, d. h., ausser vegetabilischem und animalischem Detritus besonders kleine pflanzliche und tierische Organismen, wie Diatomeen, Algen, besonders einzellige, und Protozoen; erstere zwei fand ich im Darminhalt.

Auf der chitinösen Kopfkapsel sieht man noch ein Paar von Antennen und zwei an Augen erinnernde Pigmentflecke; am Schwanzende liegt ein einziehbares kiemenartiges Organ. Die Haut ist glatt und ziemlich durchsichtig, sodass man vor der Verpuppung die noch zusammengefalteten Tracheenanhänge der Nymphe deutlich als schwarzen Fleck erkennen kann. Die Gesamtfarbe ist grünlich oder olivenbraun, was wohl teilweise von der Nahrung abhängt. Die Larven finden sich meist in grösserer Zahl und können unter besonderen Vorsichtsmassregeln leicht gezüchtet werden, wodurch man auch die männlichen Mücken erhält, die sich bei unseren Arten besonders durch kleinere Dimensionen, sowie durch die zusammenstossenden und oben gröber facettirten Augen unterscheiden. Da sie kein Blut saugen, suchen sie den Menschen und die Tiere nicht auf und sind daher schwerer zu beschaffen. Am Leichtesten erhält man sie noch an Fensterscheiben, besonders wenn sie durch eine bestimmte Windrichtung von ihren — oft ziemlich entlegenen — Brüteplätzen hergeführt werden, wie ich das oft beobachten konnte.

Zur Verpuppung spinnen die Larven ein oben offenes, dütenförmiges Gehäuse, das etwas abgeflacht ist und in welchem die entsprechend geformte Nymphe, wie hineingesteckt, sitzt, während die Athmungsorgane in Form freier Tracheenbüschel hervorragen. Die Verwandlung findet immer unter dem Was-

filamentos traqueais livres que servem para a respiração. A metamorfoze tem lugar dentro da agua, as vezes em bastante profundidade, e o inseto adulto sae perfeito e sobe pela agua com a maior facilidade, sem sequer molhar-se. E' facil repetir este processo interessante colocando um borrachudo novo numa proveta onde ha um pouco de agua; póde-se então virar o tubo, qualquer numero de vezes, sem que o mosquito sofra passando pela agua, emquanto estiver protejido pelo seu revestimento intato de pêlos e escamas.

Na agua não ajitada as larvas morrem em poucas horas, mas pódem ser conservadas em vazos de cultura ligados ao encanamento de agua; nestas condições aparece claramente que as larvas procuram o lugar de correnteza mais forte. Por este meio póde-se reunil-as em certos pontos e obrigal-as a se fixar em tubos ou laminas de vidro. Das ninfas, em estado adiantado, póde-se obter as imajens nas primeiras horas, sem uzo de agua ajitada o que aprezenta grande vantajem, visto a facilidade com que se póde encontrar as ninfas.

Tenho creado de larvas e ninfas centenares de insetos adultos pertencentes a duas especies, e, de terceira, pelo menos alguns individuos. Não é raro encontrar-se larvas infetadas por *nosema* ou contendo uma *agamomermis,* o que se reconhece facilmente, porque tanto os vermes, como os quistos de nozema, aparecem pelo tegumento transparente; geralmente, são encontrados na parte posterior do corpo, onde ha mais espaço.

Não me foi possivel observar a copulação dos adultos e não me consta que já tivesse sido descrita; póde-se encontrar os dous sexos em distancia consideravel dos seus criadouros sendo elles bastante influenciados pelo vento reinante. A absorção de sangue parece ter lugar sómente depois da copula e se limita ás femeas; póde se observar em todas as especies, sendo porém os habitos diferentes; emquanto que o *Simulium venustum* SAY reprezenta a especie que mais incomoda o homem, o *albimanum* de MACQUART ataca de preferencia os cavalos, em prezença dos quais, raramente molesta as pessoas.

serspiegel statt, oft in ziemlicher Tiefe; die Mücke schlüpft ganz fertig aus und steigt mit grösster Leichtigkeit durch das Wasser nach oben, ohne nur nass zu werden. Man kann diesen interessanten Vorgang wiederholen, wenn man die Mücke mit etwas Wasser zusammen in ein Reagensglas bringt; dasselbe kann man dann beliebig oft umdrehen, ohne der Mücke zu schaden, solange sie noch ihr vollständiges Haar- und Schuppenkleid besitzt.

In nicht bewegtem Wasser sterben die Larven bereits nach wenigen Stunden ab; man kann sie aber leicht züchten, wenn man die Gefässe an die Wasserleitung anschliesst, wobei man dann sehr schön beobachten kann, wie die Larven immer diejenigen Stellen aufsuchen, wo die Strömung am stärksten ist. Man kann sie auf diese Weise an eine bestimmte Stelle hinlocken und zur Fixirung in Glasröhren oder auf Glasscheiben veranlassen. Aus vorgerückten Nymphen erhält man die Imago in den ersten Stunden ohne besondere Vorsichtsmassregeln, was um so wichtiger ist, als es gewöhnlich nicht schwer hält, zahlreiche Nymphen einzusammeln.

Aus Nymphen und Larven habe ich zwei der hiesigen Arten zu Hunderten und eine dritte wenigstens in einigen Exemplaren gezogen. Häufig findet man Larven, welche mit einer *Agamomermis* oder mit einer *Nosema*-art inficirt sind, was man leicht erkennt, da sowohl die Cysten der letzteren, wie die Wurmlarven deutlich durch das Integument durchscheinen. Gewöhnlich sind sie im Hinterleibe zu finden, wo am meisten Raum vorhanden ist.

Bei den Imagines gelang die Beobachtung der Copulation nicht und es liegen auch, meines Wissens, keine Beobachtungen darüber vor; beide Geschlechter werden gelegentlich weit von ihren Brutplätzen beobachtet, wobei sie deutlich von der Windrichtung beeinflusst werden. Die Blutaufnahme findet wohl erst nach der Begattung statt und ist, wie schon oben gesagt, auf die Weibchen beschränkt. Sie wird bei allen unseren Arten beobachtet; jedoch verhalten sie sich dabei verschieden; während *Simulium venustum* SAY für den Menschen die lästigste Art darstellt, greift *S. albimanum* MACQ. mit Vorliebe Pferde an und

S. venustum SAY *(pertinax* KOLLAR) é observado em toda a extensão das serras costeiras do Rio de Janeiro e S. Paulo com a maior abundancia. Como a *Stegomyia* é ao mesmo tempo insistente e arisco, acompanhando o homem constantemente, mas só picando quando não é observado, de modo que o momento da picada muitas vezes passa despercebido; por isso ha muitas pessoas que não conhecem os borrachudos. A propria picada não é muito dolorosa, não obstante ser o canal de punção mais largo que nos pernilongos e sempre marcado por ponto vermelho carateristico; rapidamente, porém, segue-se forte irritação com prurido, dôr e inchação, podendo-se então expremer um liquido serozo abundante pelo canal de punção. Ha pessoas que depois de picadas no dorso da mão aprezentam tumefação intensa de toda a rejião.

Nas estações situadas entre S. Paulo e Santos, na raiz da serra, estes borrachudos invadem os carros da estrada de ferro, onde picam de preferencia as crianças mais novas como estas acuzam logo por gritos, que os paes nem sempre pódem explicar; todavia a mesma especie em São Paulo, na elevação de 700 — 800 metros acima do mar, não mostra tendencia a atacar o homem, nem sequer na vizinhaça dos seus criadouros. Isto não póde ser explicado apenas pela diferença de elevação e temperatura, porque vi as especies *rubrithorax e montanum* atacar gente na altura de 1.500 metros acima do mar. Da mesma forma o *Simulium perflavum* ROUBAUD *(ochraceum* WALKER?*)* em São Paulo, onde abunda, nunca ataca o homem; assim mesmo recebi do interior exemplares cheios de sangue humano.

Esta diferença singular de habitos que se observa tambem em alguns culícidas parece explicar-se pelo fato que estes insetos, em certos lugares são acostumados a procurar alimentação em outras fontes; porque não se póde duvidar que precizem de alimento abundante e de proveniencia animal para amadurecer os ovos. Deve-se contar por isso tambem com os grandes animais domesticos, como mostra o *nigrimanum* acima citado, que ataca,

belästigt den Menschen in deren Gegenwart kaum.

Simulium venustum SAY wird allenthalben in den Küstenketten von Rio de Janeiro und S. Paulo in grösster Menge angetroffen und verhält sich, ähnlich, wie die *Stegomyia*, zudringlich und scheu zugleich, indem es den Menschen beständig umschwärmt, aber nur in unbewachten Augenblicken sticht, sodass der Stich oft nicht einmal bemerkt wird, weswegen viele Leute die Mücke nicht kennen. Der Stich ist im Augenblick nicht sehr schmerzhaft, trotzdem der Stichkanal viel weiter ist, als bei den Mosquitos und immer als characteristischer roter Punkt erscheint. Sehr bald treten aber starke Reizerscheinungen auf, indem die Umgebung anschwillt, schmerzt und juckt, wobei sich aus dem Stichkanal reichlich seröse Flüssigkeit ausdrücken lässt. Bei manchen Leuten genügt ein Stich auf den Handrücken, um eine polsterförmige Anschwellung desselben hervorzurufen.

Während diese Art zwischen Santos und S. Paulo regelmässig in den am Fusse der Berge gelegenen Stationen in die Eisenbahnwagen eindringt und besonders gern ganz kleine Kinder sticht, wie man an deren — den Eltern oft unerklärlichem — Weinen erkennt, zeigt dieselbe in dem zwischen 700 und 800 Meter hoch gelegenen S. Paulo gar keine Tendenz, den Menschen zu verfolgen, nicht einmal in der Nähe ihrer Brutplätze. Es erklärt sich dies nicht allein aus dem Unterschiede der Temperatur und noch weniger aus dem der Lage, denn ich habe *S. rubrithorax* und *montanum* den Menschen noch bei einer Höhe von 1.500 Metern angreifen sehen. Ebenso ignorirt *S. perflavum* ROUBAUD, welches in S. Paulo gemein ist, daselbst den Menschen vollständig, während mir aus einem ziemlich entfernten Platz mit menschlichem Blut gefüllte Exemplare gebracht wurden.

Diese eigentümliche Verschiedenheit in den Gewohnheiten, die ja auch bei Stechmücken nicht selten beobachtet wird, erklärt sich wohl einfach so, dass diese Insekten an solchen Orten ihr Nahrungsbedürfniss an einer anderen Quelle zu decken gewöhnt sind, denn es unterliegt wohl keinem Zweifel, dass zur Rei-

de preferencia, os cavalos, formando as femeas mais ou menos repletas de sangue verdadeira corôa nas marjens orbitais de suas vitimas. *S. venustum* ataca tambem cavalos, cães e provavelmente muitos outros animais, sendo que, em tempos passados, as especies indijenas devem ter procurado principalmente o sangue dos grandes animais de caça.

E' conhecido que na Hungria e nos Estados Unidos especies de *Simulium,* aparecendo em exames colossaes, pódem determinar mortandade enorme do gado, perecendo os animais picados em consequencia de intoxicação ou de asfixia, porque nem as mucozas são poupadas. A ideia que os animais, que fojem como loucos, morram apenas de cansaço ou de excitação parece menos acertada, mas, é certo que pódem se ferir seriamente nessas ocaziões. Cita-se até exemplos de pessoas que sucumbiram aos ataques destes dipteros terriveis. Ha tambem na America do Norte especie que destróe os perús, o que mostra que ás vezes tambem atacam passaros. Quanto á perseguição de animais de sangue frio faltam observações e, em relação a insetos, só conheço uma.

Entre nós os borrachudos não cauzam prejuizos tão serios, nem ameaçam a vida do homem, mas, suas perseguições são suficientes para desgostal-os de certos logares e a irritação produzida pelas picadas contribue para determinar feridas supuradas, tão frequentemente observadas.

Embora, até ha pouco, todos os borrachudos estivessem reunidos no unico genero *Simulium*, parece justificado consideral-os como formando familia a parte entre os dipteros, porque não pódem entrar sem dificuldade em uma das outras. Isto tambem é hoje geralmente aceito. Para a definição desta familia servem, assim, ao mesmo tempo os caracteres do genero, dos quais SCHINER (Fauna austriaca. Die Fliegen. Wien 1864) deu boa synteze, á qual empresto o seguinte:

«Cabeça livre, face inferior breve; tromba um pouco saliente; palpos com quatro articulos sendo o bazal muito curto e o terminal bastante alongado; antenas curtas, bastante

fung der Eier eine reichliche animalische Nahrung erforderlich ist. In dieser Hinsicht ist besonders an die grösseren Haustiere zu denken, wie das bereits erwähnte Beispiel von *S. nigrimanum* zeigt, welches vorzugsweise Pferde angreift, indem es sich besonders an den Augenhöhlenrändern niederlässt, sodass die im Saugen begriffenen Weibchen oft einen vollständigen Kranz um dieselben bilden. *S. venustum* belästigt ausser Pferden auch Hunde und wahrscheinlich noch eine Reihe von anderen Tieren, wie denn natürlich die einheimischen Arten ursprünglich für ihren Blutbedarf hauptsächlich auf das grössere Wild angewiesen waren.

Es ist bekannt, dass in Ungarn und Nordamerika in Schwärmen auftretende Simuliumarten unter dem Viehbestande die grössten Verheerungen anrichten können, indem die Tiere in Folge der vielen Stiche an Intoxication oder Asphyxie zu Grunde gehen, da auch die Schleimhäute nicht verschont werden. (Weniger wahrscheinlich klingt die Angabe, dass die blosse Erregung und Ermüdung die wie toll davonlaufenden Tiere tödten kann; wohl aber können sie bei solchen Gelegenheiten zu Schaden kommen.) Man führt auch Beispiele davon an, dass Menschen dem Stich dieser Mücken erlegen sind. Es giebt übrigens auch eine Art, welche in Nordamerika unter den Truthühnern Verheerungen anrichtet, ein Zeichen, dass sie auch Vögel nicht verschonen.

Hierzulande verursachen die Simulien weder solchen Schaden, noch bedrohen sie das Leben der Menschen, aber ihre Belästigungen reichen hin, um demselben manche Gegenden zu verleiden und der durch ihren Stich bewirkte Reiz trägt dazu bei, die so häufig beobachteten eitrigen Geschwüre hervorzurufen.

Obgleich die *Simuliumarten* bis vor kurzem zu einem einzigen Genus gerechnet wurden, scheint es doch berechtigt, für dasselbe eine eigene Dipterenfamilie zu bilden, da die Unterbringung in einer anderen nicht ohne Zwang stattfinden könnte. Es geschieht dies daher auch neuerdings ziemlich allgemein. Für die Definition derselben müssen wir uns daher an die Genuscharactere halten, von de-

grossas, com dez articulações; fronte do macho tão estreita que os olhos se tocam por diante, sendo a da femea bastante larga; olhos grandes reniformes, aproximando-se da forma redonda, glabros; não ha ocelos.

Escudo abaulado, sem sutura transversal; escutelo curto, em fórma de meia lua.

Abdome com sete aneis, sendo o primeiro munido de cilios marjinais; segmento abdominal obtuzo; orgãos genitais geralmente escondidos.

Pernas comparativamente curtas e fortes; coxas grossas e achatadas, metatarsos alongados, os outros articulos tarsais muito curtos, principalmente o ultimo; unhas glabras, pulvilos rudimentares.

Esquamulas rudimentares, halteres expostos, geralmente inclinados sobre o abdome.

Azas compridas e largas, com as nervuras da marjem anterior mais espessas que as outras, as quais, ás vezes, são apenas perceptiveis. Alulas grandes com angulo saliente.»

Juntamos aqui mais uns caracteres que podiam, em parte, ser aproveitados na sistematica, se não faltassem ás vezes ou se não fossem de verificação muito dificil em exemplares montados em alfinetes. As unhas da femea muitas vezes tem do lado interno pequeno dente secundario, mas é frequentemente bastante dificil de se observar; as unhas do macho, alem de dente semelhante tem um outro por fóra. As azas são cobertas de pelos microscopicos. As nervuras costais são munidas de espinhos e de cilios em distribuição variavel. Nas pernas póde haver espinhos e pelos maiores sendo alguns dos ultimos, ás vezes situados no dorso dos tarsos. As tibias são munidas de esporões geralmente dezenvolvidos no par medio, mas reduzidos no ultimo; na tibia da frente, ás vezes, encontra-se um só esporão e outras vezes parece faltar; ha tambem esporões na extremidade de alguns articulos tarsais. Ha outros pelos menores misturados com formações que parecem pelos achatados, mas devem antes ser consideradas como escamas muito compridas e estreitas; aprezentam geralmente côr vistoza, branca ou dourada e são encontradas

nen SCHINER (Fauna austriaca. Die Fliegen. Wien. 1891) eine gute Zusammenstellung giebt, welcher wir Folgendes entnehmen:

«Kopf frei, Untergesicht kurz, Rüssel etwas vorstehend; Taster viergliedrig, das Basalglied sehr kurz, das Endglied stark verlängert; Fühler kurz, ziemlich dick, zehngliedrig; Stirn des Männchens so schmal, dass sich die Augen vorn berühren, die des Weibchens ziemlich breit; Augen gross, rundlich nierenförmig, nackt, Punktaugen fehlend.

Rückenschild hochgewölbt, eine Quernaht nicht vorhanden; Schildchen halbrund, kurz.

Hinterleib sieben- bis achtringig, der erste am Rande bewimpert, Analglied stumpf, Genitalien meistens ganz versteckt.

Beine verhältnissmässig kurz und stark, Schenkel dick, breitgedrückt, Metatarsen verlängert, Tarsenglieder sehr klein, besonders das letzte; Klauen nackt; Haftläppchen rudimentär.

Schüppchen rudimentär, Schwinger unbedeckt, gewöhnlich dem Körper aufliegend. Flügel gross und breit, die am Rande gelegenen Adern dicker als die übrigen, oft kaum wahrnehmbaren. Flügellappen gross, eckig vorspringend.»

Ich füge noch einige Charactere bei, welche sich teilweise in der Systematik verwenden liessen, wenn sie nicht manchmal fehlten oder bei gespiessten Exemplaren schwer zu constatiren wären. Die Krallen der Weibchen haben häufig an der inneren Seite einen kleinen Secundärzahn, der aber öfters schwer zu erkennen ist; die Krallen des Männchens haben ausser diesem Zahne noch einen zweiten an der Aussenseite. Die Oberfläche der Flügel ist mit mikroscopischen Härchen bedeckt und die Costaladern haben Dornen und Härchen in etwas wechselnder Anordnung. An den Beinen giebt es Dornen und einzelne grössere Haare, von denen manchmal einige auf der Dorsalfläche der Tarsen stehen. Ausserdem giebt es feinere Haare und — mit diesen vermischt oder auch allein — Bildungen, die wie platte Haare aussehen, aber eigentlich als lange und schmale Schuppen aufgefasst werden müssen. Sie zeigen gewöhnlich eine auffällige weisse oder goldene Farbe und finden sich an

em cima da cabeça, do torax e nas pernas onde ocupam principalmente a face anterior. Parecem repelir a agua protejendo assim a imajen nova; mas, como são muito caducas, pódem mais tarde deixal-a dezemparada. Caraterizam muito bem as especies quando são prezentes; sua côr, as vezes, acompanha a do fundo, outras vezes, porém, dá-se o contrario. A côr dos olhos, em exemplares frescos, é verde dourada ou aprezenta outros matizes vistozos; mas, como dezaparece nos exemplares secos, deixei de aproveital-a na parte sistematica.

De trez especies que, ha seis anos, mandei para Washington, COQUILLET considerou uma como identica ao *S. venustum* SAY; esta deve corresponder ao *S. pertinax*, citado, mas apenas superficialmente descrito, por KOLLAR. As duas outras foram consideradas identicas ao *S. nigrum* PHILIPPI, do Chile e ao *S. ochraceum* WALKER, do Mexico; ha mais duas especies descritas no Brazil, o *S. nigrimanum* MACQ. que tornei a encontrar e o *Similium amazonicum* de GOELDI que parece faltar ás nossas rejiões. Tenho mais cinco especies novas. Abaixo darei as descrições de todas estas especies, procedidas de uma chave.

Chave para derterminação
das especies brazileiras do genero *Simulium* LATR., sub-genero *Eusimulium* ROUBAUD.

1. Escudo apenas com escamas, sem outro adorno no meio. 4
2. Escudo com dezenhos 3
3. No escudo manchas alaranjadas sobre fundo escuro. Especie pequena *S. varians* n. sp. (9).
   No escudo dezenho preto sobre fundo cinzento azulado, tamanho medio *S. amazonicum* GOELDI (10).
   No escudo trez linhas ou estrias paralelas sobre fundo pardo lilaceo, especie grande. . . *S. scutistriatum* n. sp. (2).
4. Escudo vermelho; pernas bicolores, especie grande. *S. rubrithorax* n. sp. (1).
   Escudo alaranjado, tarjado de branco; especie media *S. perflavum* ROUBAUD (7).
   Escudo enegrecido 5

Kopf und Thorax auf der Oberseite; an den Beinen nehmen sie besonders die Vorderseite ein. Sie scheinen das Wasser abzustossen und so die junge Imago zu beschützen; da sie aber sehr hinfällig sind, kann die schützende Bedeckung leicht verloren gehen.

Wenn sie vorhanden sind, so kennzeichnen sie die Art sehr gut; ihre Farbe wird manchmal von derjenigen des Grundes begleitet, oft ist aber das Gegenteil der Fall. Die Farbe der Augen ist bei frischen Exemplaren goldgrün oder von anderen auffälligen Nuancen; da sie aber bei trockenen Exemplaren verschwindet, habe ich von ihrer Verwertung im systematischen Teile Abstand genommen.

Von drei Arten, welche ich vor sechs Jahren nach Washington sandte, identifizirte COQUILLET eine mit *S. venustum* SAY., diese muss dem von KOLLAR benannten, aber kaum beschriebenen *S. pertinax* entsprechen. Die beiden anderen wurden als *S. ochraceum* WALKER aus Mexico und *S. nigrum* PHILIPPI aus Chile bestimmt. Es sind noch zwei brasilianische Arten beschrieben, *S. nigrimanum* MACQ., welches ich wieder aufgefunden habe und *S. amazonicum* GOELDI, welches in unserer Gegend zu fehlen scheint. Ich besitze ausserdem noch fünf Arten, welche ich als neu ansehe und von denen vier aus S. Paulo stammen. Von diesen Arten gebe ich einen Schlüssel und weiter unten die genauere Beschreibung.

Schlüssel zur Bestimmung
der brasilianischen Arten vom Genus *Simulium* LATR., Subgenus *Eusimulium* ROUBAUD.

1. Scutum nur mit Schüppchen, ohne Zeichnung in der Mitte 4
2. Scutum mit Zeichnungen 3
3. Scutum mit orangefarbenen Flecken auf dunklem Grunde. Kleine Art. *S. varians* n. sp. (9).
   Scutum mit schwarzer Zeichnung auf graublauem Grunde. Mittelgrosse Art. *S. amazonicum* GOELDI (10)
   Scutum drei parallelen Linien oder Striemen auf braun-lilafarbenem Grunde. Grosse Art . *S. scutistriatum* n. sp. (2).
4. Scutum roth; Beine zweifarbig. Grosse Art . . . . . *S. rubrithorax* n. sp. (1).

5. Cabeça corpo e halteres escuros; pernas unicolores 7
6. Pernas bicolores 8
7. Costa e subcostal com pelos, projetados na celula costal; especie pequena *S. hirticosta* n. sp. (4).
   Costa com pelos mais curtos; especie grande . . . . *S. montanum* PHIL. (3).
8. Halteres pardo-ocraceos; femures posteriores enegrecidos. *S. venustum* SAY, *var. infuscata* n. *var.* (5a).
9. Halteres de côr amarela muito clara. . 10
10. Antenas completamente negras; especie pequena . . . *S. exiguum* n. sp. (8).
    Antenas ocraceas, pelo menos na baze, especies maiores 11
11. Tibia anterior com fundo enegrecido. *S. albimanum* MACQ. (6).
12. Tibias anteriores com fundo ocraceo bastante claro. *S. venustum* SAY. (5).

1. *Simulium rubrithorax* n. sp. Côr geral preta e vermelha, comprimento 3 a 4 mm.

Cabeça, preta com brilho prateado, tromba e palpos pardo-ferrujinozos; occiput com pelos bastante compridos.

Torax: escudo vermelho escuro, alaranjado ou pardacento, com escamas piliformes douradas escutelo como o escudo, com pelos escuros na marjem livre; pleuras côr de chocolate, ás vezes um pouco avermelhada, com brilho cinzento.

Abdome, em cima enfuscado, com brilho cinzento; dos lados e em baixo com cintas claras e escuras.

Pernas: primeiro par ocraceo até os joelhos, com pelos e escamas finas, ora claras ora escuras, tibias, na parte anterior, com pó claro e escamas piliformes brancas, o resto ocraceo ou pardacento, o pé quazi preto. Segundo par como o primeiro, mas o metatarso, nos terços posteriores, de côr clara, como tambem a tibia com exceção das extremidades. Terceiro par: coxas escuras, trocanteres e femures ocraceos, como tambem a baze dás

Scutum orange, mit weissem Saum. Mittelgrosse Art *S. perflavum* ROUBAUD (7).
Scutum schwärzlich 5
5. Kopf, Leib und Halteren dunkel, Beine einfarbig 7
6. Beine zweifarbig 8
7. Costa und Subcostalader mit Haaren, die sich in die Costalzelle hineinneigen. — Kleine Art. . *S. hirticosta* n. sp. (4).
   Costa mit kürzeren Haaren. Grosse Art. *S. montanum* PHIL. (3).
8. Halteren bräunlich ockergelb; hinterste Schenkel schwärzlich. *S. venustum* SAY var., *infuscata* n. var. (5a).
9. Halteren sehr hell gelb. 10
10. Antennen ganz schwarz. Kleine Art. *S. exiguum* n. sp. (8).
    Antennen wenigstens an der Basis ockergelb. Grössere Arten 11
11. Vorderste Tibia mit dunklem Grunde. *S. albimanum* MACQ. (6).
    Vorderste Tibia mit ziemlich hell ockergelbem Grunde. *S. venustum* SAY (5).

1. *Simulium rubrithorax* n. sp. Gesamtfarbe schwarz und rot, Länge 3—4 mm.

Kopf weiss mit Silberglanz, Rüssel und Palpen braun; Antennen bräunlich-rostfarben; Hinterkopf mit ziemlich langen Haaren.

Thorax: Rückenschild dunkel orange oder bräunlich rot, mit goldenen haarartigen Schuppen; Schildchen, wie der Schild, mit dunklen Haaren am freien Rande; Pleuren chocoladefarbig, manchmal etwas rötlich, mit grauem Schimmer.

Abdomen oben bräunlich, mit grauem Schimmer, seitlich und unten mit helleren und dunkleren Binden.

Beine: das erste Paar bis zu den Knieen ockergelb, mit Härchen und schmalen Schuppen, die teils hell, teils dunkel sind; Tibia an der Vorderseite hell bestäubt und mit weissen haarartigen Schüppchen besetzt, der Rest ockergelb oder braun; der Fuss fast schwarz. Zweites Paar, wie das erste, aber der Metatarsus in den oberen Dritteln von heller Farbe, die Tibia ebenso, mit Ausnahme der beiden

tibias que no restante são enegrecidas, mas cobertas de escamas estreitas claras; metatarsos na metade bazal é na maior parte da sua circumferencia claros, o resto escuro, apenas a baze do segundo articulo do pé um pouco mais claro. Unhas com um dente.

Azas como de costume, apenas na baze da costa com uns pelos mais compridos, projetados na celula costal; halteres com o capitulo de côr palida de cera, tornando-se escura em direção á baze.

Descrito de algumas femeas apanhadas na serra da Bocaina a 1500 m. de altura e em Batataes.

2. *Simulium scutistriatum* n. sp. Côr geral enegrecida, comprimento pouco mais de 4 mm.

Cabeça com fundo pardo, coberto de pó claro, mostrando escamas e pelos com brilho dourado. Tromba e palpos enegrecidos, antenas olivaceo-pardacentas, mais claras na baze e no lado inferior.

Torax: com fundo chocolate claro, em cima com matiz lilaz e escamas douradas; ha uma faixa lonjitudinal média e duas laterais mal limitadas, de côr mais escura; no meio da primeira ha uma linha muito escura e bem definida; as pleuras e o esterno com brilho claro.

Abdome: o primeiro segmento de côr preta aveludada e com pelos marjinais dourados, o resto de côr preta mate com brilho cinzento.

Pernas: primeiro par ferrujinozo claro até o joelho, a tibia enegrecida, com os trez quartos superiores da face anterior mais claros e cobertos de escamas brancas; todo o pé enegrecido; o par medio com coxa e trocanter ocraceos, um tanto enegrecidos; femur com baze ocracea enfuscada no resto, como a tibia, é chocolate, porém, nos dois terços superiores da face anterior com escamas esbranquiçadas sobre fundo claro; metatarso, na metade bazal, com fundo ocraceo e escamas brancas; todo o resto enegrecido. Terceiro par: a baze ocracea, os dois terços inferiores do femur chocolate, mas com escamas claras; a tibia com a face anterior ocracea e coberta

Enden. Drittes Paar, Coxa dunkel, Trochanteren und Schenkel ockergelb, ebenso die Basis der Schienen, die sonst schwärzlich, aber mit schmalen hellen Schuppen bedeckt sind; Metatarsen im Basalteile und am grössten Teile ihres Umfanges hell, der Rest des Fusses dunkel, nur die Basis des zweiten Tarsalgliedes etwas heller. Krallen mit einem Zahn.

Flügel wie gewöhnlich, nur am Basalteile der Costa mit etwas längeren Haaren, die sich in die Costalzelle hineinneigen; Halteren am Köpfchen von blasser Wachsfarbe, nach der Basis zu dunkel werdend.

Beschrieben nach einigen Weibchen, die in der Serra da Bocaina (bei 1500 M. Höhe) und in Batataes gefangen wurden.

2. *Simulium scutistriatum* n. sp. Gesamtfarbe schwärzlich, Länge etwas über 4 mm.

Kopf mit dunklem, hell bestäubten Grunde und goldglänzenden Härchen und Schüppchen. Rüssel nnd Palpen schwärzlich; Antennen bräunlich ockergelb, an Basis und Unterseite heller.

Thorax mit hell chocoladefarbenem Grunde, oben ins Lilafarbene spielend und mit goldfarbenen Schuppen besetzt, mit einer mittleren und zwei seitlichen dunklen Längsstriemen, die nicht deutlich abgegrenzt sind; in der Mitte der ersteren verläuft eine scharf gezeichnete sehr dunkle Längslinie; Pleuren und Sternum zeigen einen hellen Schimmer.

Abdomen: das erste Segment sammetschwarz, mit goldfarbenen Haaren gesäumt, der Rest mattschwarz mit grauem Schimmer.

Beine: das erste Paar bis zum Knie von heller Rostfarbe, die Tibia schwärzlich, aber die oberen drei Viertel der Vorderseite heller und mit weissen Schuppen besetzt, der ganze Fuss schwärzlich; zweites Paar: Coxa und Trochanter ockergelb, etwas schwärzlich, Femur mit ockergelber aber etwas gebräunter Basis; der Rest chocoladenfarbig, ebenso die Tibia, welche jedoch an den zwei oberen Dritteln der Vorderfläche weissliche Schuppen auf hellem Grunde aufweist, Metatarsus in seiner basalen Hälfte mit ockergelbem Grunde mit weissen Schuppen, der Rest des Fusses schwärzlich; drittes Paar mit ockergelber Basis, die zwei unteren Drittel des Schenkels

de pelos dourados que se estendem ainda sobre o fundo escuro do terço inferior; o pé egual ao segundo par, tendo, porém, tambem o segundo articulo tarsal a baze clara. Unhas com dente bazal bastante escondido.

Azas e halteres como na especie anterior.

Descrição fundada no exame de uma femea, apanhada pelo Sr. DAVID MADEIRA em Itaguahy (Estado do Rio de Janeiro). Lembra muito o *Similium rubrithorax,* mas distingue-se demais, para ser considerado apenas como variedade. Na coleção do Instituto ha mais duas femeas apanhadas em Xerém pelo Dr. A. NEIVA.

3. *S. montanum* PHIL. (?) Damos em seguida a tradução da descrição orijinal feita em lingua alemã por PHILIPPI no catalogo dos dipteros chilenos:

Preto, subglabro, unicolor. Comprimento do corpo duas linhas. Nas montanhas de *Chacabuco,* perto de *Catenu* etc. A auzencia total de manchas e dezenhos distingue esta especie. O occiput é coberto de pelos cinzentos e o peito de pequenos cabelos sedozos, finos e apostos, que é precizo procurar com lente de aumento.

Damos em seguida a descrição de especie encontrada aqui e considerada identica.

Côr geral preta ou chocolate escura; tamanho cerca de 3 $^1/_2$ mm.

Cabeça chocolate, a tromba um pouco mais clara, palpos quazi pretos, antenas pretas com pubecencia fina e clara e trez segmentos bazais ocraceo-pardacentos. Clipeo, fronte e vertice com escamas piliformes douradas; na marjem dos olhos em cima e atraz ha pelos grossos escuros, inclinados para diante; no vertice ha uma linha mediana deprimida.

Torax: na rejião que corresponde aos lobulos protoracicos ha pelos escuros; o escudo e o escutelo com escamas piliformes douradas sobre fundo chocolate e com algumas estrias lonjitudinais indistintas; as pleuras lijeiramente avermelhadas na metade posterior; o escutelo um pouco mais claro com fileiras marjinais de pelos escuros, compridos e grossos.

chocoladenbraun, aber mit weissen Schuppen, Tibia an der Vorderfläche ockergelb und mit goldfarbenen Haaren besetzt, die sich auch auf den dunklen Grund des unteren Drittels erstrecken; der Fuss, wie derjenige des zweiten Paares, aber das zweite Tarsalglied ebenfalls mit heller Basis. Krallen mit etwas versteckten basalem Zahn.

Flügel wie bei der vorigen Art.

Die Beschreibung ist nach einem Weibchen, welches in Itaguahy (Staat Rio de Janeiro) von Herrn D. MADEIRA gefangen wurde; es erinnert sehr an *S. rubrithorax,* ist aber doch zu verschieden, um bloss als Varietät zu gelten. In der Sammlung des Instituts befinden sich noch zwei Weibchen, die von Dr. A. NEIVA gefangen wurden.

3. *Simulium montanum* PHIL. Ich gebe hier die Originalbeschreibung von PHILIPPI in «Aufzählung der chilenischen Dipteren» (Verh. d. k. k. bot. Ges., Bd. XV, 1865, pag. 633):

S. nigrum, subglabrum, unicolor. Long. corp. 2 lin.

In montibus de *Chacabuco* dictis, prope *Catenu* etc.

Abwesenheit aller Flecken und Zeichnungen zeichnen diese Art aus. Der Hinterkopf ist mit greisen Haaren bekleidet und die Brust mit feinen anliegenden, seidenartigen Härchen, die man mit der Lupe suchen muss.

Nachfolgend gebe ich die Beschreibung der hier gefundenen und als übereinstimmend angesehenen Species:

Allgemeinfärbung schwarz oder dunkelchocoladebraun; Länge ca. 3 $^1/_2$ mm.

Kopf chocoladenbraun, der Rüssel etwas heller, die Palpen fast schwarz, die Antennen schwarz, mit feiner heller Behaarung, und drei Basalsegmenten von bräunlich ockergelber Farbe. Clypeus, Stirn und Scheitel mit goldenen, haarähnlichen Schuppen; am Orbitalrande stehen hinten und oben dicke, dunkle Haare, die sich nach vorn neigen; auf dem Scheitel ist eine vertiefte Medianlinie.

Thorax mit dunklen Haaren in der Gegend, welche den prothoracischen Höckern entspricht, Schild und Schildchen mit goldfarbenen Haarschüppchen auf chocoladebraunem Grunde und einigen undeutlichen Längsstrie-

Abdome côr de chocolate mais ou menos enegrecido, com pelos dourados na marjem do primeiro segmento e outros mais curtos na dos outros.

Azas com a baze pardacenta, a costa chocolate com pelos e espinhos, sub-costal na baze só com pelos, no apice tambem com espinhos, as outras nervuras pardacentas; o fundo da aza com pontilhado escuro; na baze da aza ha uma faixa anterior de pelos grossos e escuros e um outro posterior de pelos finos compridos e de côr clara; halteres pardo-amarelados com o capitulo enfuscado.

Pernas enfuscadas, com pelos escuros e escamas piliformes; a incizão no segundo tarso posterior não é bem acuzada. Unhas com dente bazal curto.

Esta especie foi encontrada na serra da Bocaina, a 1.500 metros de altitude, e creada de larvas encontradas na vizinhança de Petropolis. Se for identica á especie de PHILIPPI deve ter transposto os Andes, fato excepcional, que talvez, se possa explicar pela facilidade com que se cria em logares elevados.

4. *S. hirticosta* n. sp. Tamanho geral apenas 2 mm. Côr geral chocolate.

Tromba, palpos e antenas castanhos, as ultimas um pouco mais claras, com pubecencia fina de côr esbranquiçada.

Torax côr chocolate, aveludado no escudo, um pouco mais claro no escutelo, que tem pelos marjinais compridos.

Abdome pardo-chocolate com a marjem dos segmentos um pouco mais clara, de brilho cinzento, e munida de pelos mais claros que o fundo.

Pernas de côr uniforme pardo-amarelo, com os pelos maiores pardos, os pelos finos e as escamas estreitas em parte esbranquiçadas. Unhas com pequeno dente bazal.

Azas com as nervuras de colorido pardacento claro, a costal e sub-costal cobertas de cilios bastante compridos, na primeira celula sub-costal. Halteres da côr do abdome.

Descrito de duas femeas, apanhadas na cidade de S. Paulo, onde a especie parece ser muito rara.

men; die Pleuren in der hinteren Hälfte leicht rötlich; das Schildchen etwas heller mit randständigen Reihen langer und dicker Haare von dunkler Farbe.

Abdomen chocoladebraun mehr oder weniger ins Schwarze übergehend, mit goldenen Haaren am Rande des ersten Segmentes und ebensolchen, aber kürzeren an den folgenden.

Flügel mit bräunlicher Wurzel, Costa braun mit Haaren und Dornen, Subcostalader an der Basis nur mit Haaren, am Ende auch mit Dornen; die anderen Adern bräunlich; Flügelgrund dunkel punktirt; an der Flügelwurzel nach vorn ein Büschel von dicken und dunklen Haaren, nach hinten zu ein ebensolches, aber mit langen, dünnen und goldglänzenden Haaren. Halteren bräunlich gelb mit mehr braunem Capitulum.

Beine bräunlich mit dunklen Haaren und Haarschuppen; der Einschnitt am zweiten Tarsus des Hinterfusses wenig deutlich. Die Krallen mit einem kurzen basalen Zahne.

Diese Art wurde in der Serra da Bocaina bei 1500 M. Höhe gefangen und auch aus Larven gezüchtet, die in der Nähe von Petropolis gefunden wurden. Wenn sie mit der Art von Philippi identisch ist, so muss sie die Anden überschritten haben, ein ganz ungewöhnliches Vorkommniss, das sich aber vielleicht aus der Leichtigkeit erklären liesse, mit welcher diese Art sich an hochgelegenen Orten entwickelt.

4. *Simulium hirticosta* n. sp. Gesamtfarbe braun; Gesamtlänge kaum 2 mm.

Rüssel, Palpen und Antennen kastanienbraun, die letzteren etwas heller mit feiner weisslicher Behaarung.

Thorax chocoladebraun, am Schilde sammetartig; das Schildchen etwas heller und mit langen, randständigen Haaren.

Abdomen chocoladebraun, mit etwas hellerem grauglänzenden Rande der Segmente und Haaren, die heller sind als der Grund.

Beine einfarbig gelblich braun, die grösseren Haare dunkel, die feineren Haare und Schüppchen zum Teil weisslich. Die Krallen mit kleinem Zahn an der Basis.

Flügel mit hellbräunlichem Geäder, Costa und Subcostalader mit ziemlich langen Haaren

5. *S. venustum* SAY *(S. pertinax* KOLLAR).

A especie mais comum em Rio de Janeiro e S. Paulo e que se póde considerar como orijinal da descrição de KOLLAR foi determinado por COQUILLET como *S. venustum* SAY. Com efeito a comparação com as descrições desta especie e alguns exemplares que obtive da America do Norte mostra grande semelhança até nas menores particularidades anatomicas. Quanto a côr, não ha diferença bastante pronunciada para impedir a identificação, tanto mais que a especie é considerada variavel. Não se podendo facilmente supor uma disseminação por via maritima, só resta a hipoteze que a especie se tenha estendido sobre o terreno que nos separa dos Estados Unidos, onde é encontrada em extensão muito vasta. Comquanto esta idéa, *a priori*, possa parecer estranha, não tem nada de impossivel visto a extensão e altura das cordilheiras que ligam as rejiões e onde devem abundar logares favoraveis para a procriação.

Em todo o cazo não sendo a questão completamente decidida, convem dar aqui uma descrição feita com exemplares nossos.

Tamanho geral 2 a 2,5 mm, côr geral enegrecida.

Tromba pardo-cinzenta, com pelos; antenas com pubecencia esbranquiçada, de colorido ocraceo pardacento; palpos da mesma côr, porém, mais escuros; clipeo, fronte e vertice com pó prateado; olhos de côr verde dourado; occiput côr de ardozia com brilho alvacento.

Escudo e escutelo côr de ardozia, com escamas piliformes douradas que, no escudo, são geralmente bastante espaçados e pouco compridos; no escutelo seguem em parte direção transversal.

Abdome enegrecido, o primeiro anel com pelos marjinais dourados, bastante compridos; em baixo com reflexo claro.

Azas com pelos compridos em redor da baze, com as primeiras nervuras espessadas, variando de ocraceo a pardacento; as outras nervuras de côr pardacenta apagada.

Halteres de côr amarela de cêra muito palida.

besetzt, welche in die erste Subcostalzelle hineinragen. Halteren von der Farbe des Abdomens.

Die Beschreibung bezieht sich auf zwei Weibchen, welche in der Stadt São Paulo gefangen wurden, wo die Art jedoch selten zu sein scheint.

5. *Simulium venustum* SAY (=*pertinax* KOLLAR).

Die bei Rio de Janeiro und S. Paulo weitaus häufigste Art, welche wahrscheinlich dem Originale der KOLLAR'schen Beschreibung entspricht, wurde von COQUILLET als *S. venustum* SAY bestimmt. In der Tat zeigt eine Vergleichung mit den Beschreibungen dieser Art und einigen Exemplaren, welche ich aus Nordamerika erhielt, weitgehende Aehnlichkeit auch in den kleinsten anatomischen Details. Auch in der Färbung sind die Unterschiede nicht genügend, um eine Identificirung auszuschliessen, um so mehr, als die Art als veränderlich gilt. Da eine Verbreitung auf dem Seewege nicht wohl angenommen werden kann, bleibt nur die Voraussetzung, dass die Art sich über das ganze Gebiet verbreitet habe, welches uns von den Vereinigten Staaten trennt, wo dieselbe in weiter Verbreitung gefunden wird. Obgleich diese Idee a priori befremden kann, enthält sie doch nichts Unmögliches, wenn man die Ausdehnung und Höhe der Bergketten in Betracht zieht, welche diese Gegenden verbinden und in welchen reichlich günstige Brutstätten vorkommen müssen.

Da diese Frage nicht vollständig entschieden ist, scheint es angebracht, hier eine Beschreibung zu geben, welche unseren Exemplaren entnommen ist.

Gesamtgrösse 2—2,5 mm. Allgemeinfärbung schwärzlich.

Rüssel graubraun, behaart, Antennen bräunlich ockergelb, mit weisslicher Pubescenz; Palpen von derselben Färbung, doch etwas dunkler; Clypeus, Stirn und Scheitel silbern bestäubt, Augen goldgrün, Hinterkopf schieferfarben mit grauem Schimmer.

Rückenschild und Schildchen schieferfarben, mit goldenen haarartigen Schüppchen, die nicht sehr lang und gewöhnlich am ersteren

Pernas; primeiro par ocraceo até os joelhos, tibias da mesma côr, com exceção do apice que é pardacento e da face anterior que é coberta de escamas brancas estreitas e compridas em toda a extensão, menos nas duas extremidades; tarso preto de fulijem; segundo par, como o primeiro, mas toda a tibia branca, com alguns espinhos pretos no apice; tarsos branco-amarelados, com a porção terminal dos articulos pardacentos, o ultimo inteiramente de côr pardacenta clara; terceiro par ocraceo até os joelhos; as tibias com a porção bazal, até perto do meio, coberta de pó e pelos brancos; o resto, pardo amarelado; primeiro tarso (metatarso) branco, até perto do apice, o segundo apenas na metade bazal, o resto pardacento. Unhas da femea com um dente na baze, as do macho com dois. A ninfa tem duas vezes seis filamentos respiratorios ramificados, como a do *S. venustum* SAY, dos Estados Unidos.

5. *Simulium venustum* var. *infuscata*, n. var. Encontrei com bastante frequencia um tipo um pouco menor que se distingue pelos carateres seguintes: Todas as côres são um pouco mais carregadas e escuras; as partes ocraceas das pernas, principalmente o femur do terceiro par, mais ou menos enegrecidas; os halteres de côr ocracea, um pouco pardacenta.

Esta fórma encontrada, ora só, ora misturada com a precedente, parece reprezentar apenas variedade, tendo-se notado variações semelhantes no *S. venustum* da America do Norte; parece ser mais comum em logares elevados e com clima mais frio.

6. *S. nigrimanum* MACQ. (A especie foi descrita como *S. nigrimana* por MACQUART; não ha razão de ser a fórma feminina porque M. não escreveu *Simulia* como fazem alguns autores.)

Dou em seguida a descrição original (*Diptères exotiques nouveaux* etc. I, pg. 88):

«Long. 1 $^1/_2$. Mâle. Pieds: cuisses fauves; jambes et tarses noirâtres; premier article des tarses intermédiaires et postérieurs blanc, à extrémité noire; deuxième noir, à base blanche. Du Brésil, au nord de la Capitainerie de Saint Paul».

wenig dicht sind. Am Schildchen liegen sie teilweise quer.

Abdomen schwärzlich, das erste Segment mit ziemlich langen, randständigen goldgelben Haaren, auf der Unterseite mit hellem Schimmer.

Flügel mit langen Haaren um die Wurzel, die ersten, verdickten Adern ockergelb bis bräunlich; die anderen verwaschen bräunlich.

Halteren von sehr blasser gelblicher Wachsfarbe.

Beine: das erste Paar ockergelb bis zu den Knien, Schienen von derselben Farbe, ausgenommen die bränliche Spitze und die Vorderfläche, welche, mit Ausnahme der beiden Enden, in ihrer ganzen Ausdehnung mit langen und schmalen weissen Schuppen bedeckt ist, Tarsen russbraun; zweites Paar, wie das erste, aber die ganze Tibia weiss mit einigen schwarzen Dornen an der Spitze, Tarsen gelblichweiss mit bräunlichem Endteile, das letzte Glied ganz hellbräunlich; drittes Paar bis zu den Knien ockergelb, Basalteil der Tibien bis nahe zur Mitte weiss bestäubt und behaart, der Rest gelblich braun; der erste Tarsus (Metatarsus) bis nahe zur Spitze weiss, der zweite nur in der Basalhälfte, der Rest bräunlich. Krallen des Weibchens innen an der Basis mit einem, Zahne, die des Männchens beiderseits mit einem solchen. Die Nymphe hat zwei mal sechs Respirationsröhren, deren Verzweigung mit derjenigen von *S. venustum* SAY, aus den Vereinigten Staaten übereinstimmt.

5 a. *Simulium venustum* var. *infuscata*, n. var.

Ich fand ziemlich häufig einen etwas kleineren Typus, welcher sich durch folgende Merkmale unterschied: Alle Farben sind etwas gesättigter und dunkler; die ockergelben Teile der Beine, besonders der Schenkel des letzten Paares mehr oder weniger geschwärzt; Halteren von ockergelber, etwas bräunlicher Farbe.

Diese Form wurde bald allein, bald mit der vorigen vermischt gefunden und scheint nur eine Varietät zu repräsentiren, wie ähnliche auch bei S. venustum in Nordamerika angeführt werden; sie scheint in höher gelegenen und kälteren Gegenden häufiger zu sein.

6. *Simulium nigrimanum* MACQ. Im Originale steht «nigrimana», doch hätte diese

Creio ter observado esta especie em Avanhandava (Noroeste de S. Paulo) onde só encontrei femeas em grande numero. Dou a descrição destas:

Côr geral preta, comprimento de 3 a 3,5 mm.

Tromba e palpos pardos; os tóros das antenas ocraceos, o resto, ocraceo na baze, tornando-se logo enfuscado, coberto de pubecencia esbranquiçada; clipeo, fronte e vertice com pó alvacento.

Torax preto, escudo e escutelo com escamas piliformes de côr dourada mate dispostas em pequenos grupos; o aspeto macroscopico e mais claro que no *venustum.*

Abdome preto.

Azas muito claras, as nervuras grossas pardacentas, as outras com côr muito apagada; halteres da mesma côr branco-amarelada de cera, como no *venustum.*

Pernas: primeiro par: coxa, trocanter e femur ocraceos, o ultimo enfuscado no apice; tibia escura, a face anterior com escamas piliformes brancas; segundo par: coxa parda, trocanter e femur ocraceo, com escamas piliformes douradas, tibia parda com pelos esbranquiçados, nas extremidades de cör clara, com pelos brancos; os trez quartos superiores do metatarso brancos, com pelos brancos, o resto preto; terceiro par: coxa, trochanter, femur e tibia pardos, os dois ultimos com baze amarelada, com pelos brancos, metatarsos com os dois terços inferiores brancos com pelos brancos. Unhas sem dente, apenas com saliencia bazal conica.

7. *Simulum perflavum* E. ROUBAUD 1906. Esta especie foi considerada por COQUILLET como indentica com *S. ochraceum* WALKER, determinação que não concorda de modo completamente satisfatorio com a descrição, tal qual se acha reproduzida no livro de JOHANNSEN. Exemplares que tinha cedido ao British Museum foram descritos por ROUBAUD como *S. perflavum.* Dou em seguida a reprodução da descrição original deste autor.

♀ «D'un beau jaune d'or. Face et front argentés, antennes testacé clair Epaules et bords du thorax légèrement argentés.

Schreibweise nur Berechtigung, wenn Macquart, wie manche Autoren, den Genusnamen «Simulia» geschrieben hätte, was nicht der Fall ist. Ich gebe hier den Text der Originalbeschreibung (in *Diptères exotiques nouveaux* etc. I, pg. 88):

«Long. 1 ½ l. Mâle. — Pieds: cuisses fauves: jambes et tarses noirâtres; premier article des tarses intermédiaires et postérieurs blanc, à extrémité noire: deuxième noir, à base blanche. Ailes blanches. — Du Brésil, au nord de la Capitainerie de Saint-Paul.»

Ich glaube, diese Art in Avanhandava (Nordwesten von São Paulo) beobachtet zu haben, wo ich jedoch nur Weibchen in grosser Zahl fand: ich gebe hier die Beschreibung derselben.

Allgemeinfärbung schwarz; Länge 3—3,5 mm.

Rüssel und Palpen braun, Antennen mit ockergelben Tori, die nächsten Basalglieder von derselben Farbe, die bald in's Braune übergeht, alle mit weisslicher Pubescenz; Clypeus, Stirn und Scheitel weisslich bestäubt.

Thorax schwarz, Scutum und Scutellum mit haarartigen Schuppen von mattgoldener Farbe, die in kleinen Gruppen angeordnet sind; macroscopisch erscheinen sie grau und heller als bei *S. venustum.*

Abdomen schwarz.

Flügel sehr hell; die verdickten Adern bräunlich, die andern von sehr verwaschener Farbe; Halteren von derselben blassgelblichen Wachsfarbe, wie bei *S. venustum.*

Beine: Erstes Paar an Coxa, Trochanter und Femur ockergelb, letzterer am Apex braun; Tibia dunkel, an der Vorderfläche mit weissen haarartigen Schuppen; zweites Paar: Coxa braun, Trochanter und Femur ockergelb, mit goldenen, haarartigen Schuppen; Tibia braun mit weisslichen Haaren, an den Enden jedoch hell und mit weissen Haaren; obere drei Viertel des Metatarsus weiss, mit weissen Haaren, der Rest schwarz; drittes Paar: Coxa, Trochanter, Femur und Tibia braun, die beiden letzteren mit gelblicher Basis und weissen Haaren; Metatarsus an den unteren zwei Dritteln weiss und weiss behaart, der Rest schwarz.

Balanciers jaune pâle. Ailes hyalines à nervures peu distinctes.

Pattes entièrement testacé pâle, sauf l'extrémité des tibias postérieurs qui est légèrement enfumée. Les tarses noirs, sauf les métatarses postérieurs qui sont pâles à extrémité noire. Expansion faible au métatarse, n'atteignant pas l'incision tarsienne.

Griffes unidentées.

Abdomen testacé, plus clair á la base, à incisions noirâtres sur les côtés des segments moyens. Les deux premiers segments avec la collerette jaune citron. Longueur 2 millimètres.

♂ Identique á la femelle par sa teinte générale. Le thorax est d'un jaune d'or plus vif; les yeux volumineux sont brun rougeâtre, l'abdomen brun velouté soyeux, les deux segments basilaires plus clairs, ainsi que l'extrémité.

Deux taches argentées sur les côtés des segments 3 et 4. Même taille.

Assez voisine de *S. ochraceum* WALKER, du Mexique, cette curieuse espèce se distingue, d'après la description, par la teinte jaune d'or uniforme du thorax, sans stries blanches; l'absence de taches noires aux fémurs et tibias, l'abdomen testacé et non noirâtre.

Origine: Brésil, État de Santo Paulo, Dr. LUTZ. (Collection du British Museum.)»

Dou em seguida descrição feita antes de conhecer o trabalho do Sr. ROUBAUD do qual só tive conhecimento nestes ultimos dias.

Femea. Côr prevalecente amarelo alaranjado, tamanho 2—3 mm.

Tromba ocracea escura; palpos ocraceos, enfuscados na parte superior onde ha pelos maiores de côr ocracea; antenas ocraceas com pubecencia prateada, clipeo, fronte, vertice e occiput com polen e pelos prateados sobre fundo côr de ardozia.

Torax, alaranjado em cima, com escamas compridas e estreitas de côr de ouro; em baixo ocraceo, mais ou menos pardacento; nas marjens das pleuras e dos lobulos protoracicos o escudo é largamente tarjado de branco prateado.

Abdome com o primeiro segmento ocra-

Krallen ohne Zahn, nur mit conischem basalen Vorsprung.

7. *Simulium perflavum* E. ROUBAUD 1906. Diese Art wurde von COQUILLET als identisch mit *S. ochraceum* WALKER angesehen, doch stimmt dieselbe nicht ganz befriedigend mit der Beschreibung überein, wie ich sie im Buche von JOHANNSEN (s.u.) wiedergegeben finde. Exemplare, welche ich dem *British Museum* gegeben hatte, wurden von ROUBAUD als *S. perflavum* beschrieben. Ich gebe hier die Originalbeschreibung dieses Autors wieder.

« ♀ D'un beau jaune d'or. Face et front argentés, antennes testacé clair. Epaules et bords du thorax légèrement argentés.

Balanciers jaune pâle. Ailes hyalines à nervures peu distinctes.

Pattes entièrement testacé pâle, sauf l'extrémité des tibias postérieurs qui est légèrement enfumée. Les tarses noirs, sauf les métatarses postérieurs qui sont pâles à l'extrémité noire. Expansion faible au métatarse, n'atteignant pas l'incision tarsienne.

Griffes unidentées.

Abdomen testacé, plus clair à la base, à incisions noirâtres sur les côtés des segments moyens. Les deux segments avec la collerette, jaune citron. Longueur, 2 millimètres.

♂ Identique â la femelle par sa teinte générale. Le thorax est d'un jaune d'or plus vif; les yeux volumineux sont brun rougeâtre, l'abdomen brun velouté soyeux, les deux segments basilaires plus clairs, ainsi que l'extrémité.

Deux tâches argentées sur les côtes des segments 3 e 4. Même taille.

Assez voisine de *S. ochraceum* WALKER, du Méxique, cette curieuse espèce se distingue, d'après la description, par la teinte jaune d'or uniforme du thorax, sans stries blanches; l'absence de taches noires aux fémurs et tibias, l'abdomen testacé et non noirâtre.

Origine: Brésil, Etat de Santo Paulo. Dr. LUTZ. (Collection du *British Museum.*)»

Ich gebe hier noch eine Beschreibung, welche ich entwarf, ohne die Arbeit des Herrn ROUBAUD zu kennen, die mir erst in den letzten Tagen zu Gesicht kam.

Weibchen. Vorwiegende Farbe orangegelb; Grösse 2—3 mm.

ceo, franjado de pelos prateados, o resto tornando-se enfuscado ou enegrecido.

Pernas ocraceas, com escamas piliformes e com pelos curtos e escassos, ora brancos, ora escuros; o apice da tibia anterior enfuscado apenas na face posterior; terço apical da tibia posterior e todo o pé anterior côr de chocolate; nos pares posteriores, os metatarsos são esbranquiçados nos dois terços bazais e o segundo tarso do par medio tambem em cerca da metade bazal; o resto dos pés é pardo-chocolate.

Azas sem caracteres especiais; halteres com o pedunculo pardo-ocraceo, o capitulo côr de cêra palido-amarelada.

O macho se distingue pelos caracteres sexuais essenciais e acessorios.

Os olhos na femea são misturados de verde e alaranjado vivo; no macho a ultima côr prevalece na parte de cima onde ha facetas maiores.

As unhas, na femea, têm pequeno dente secundario, de percepção muitas vezes bastante dificil; no macho ha dous, sendo um claro e outro escuro.

A ninfa tem oito filamentos respiratorios, saindo de trez ramificações; de uma nacem dois e das outras cada vez trez filamentos.

A larva é encontrada em abundancia perto de S. Paulo, misturada com a de *Simulium venustum*, que é menos abundante. As observações biolojicas referem-se a estas duas especies.

Dou em seguida a descrição de *Simulium ochraceum* WALKER *(Ent. Soc. Trans.* V. 332), copiada de JOHANNSEN: *Aquatic nematocerous diptera* (Albany 1903) pg. 370:

Female: Testaceous with white tomentum; head white; antennae testaceous; thorax ochraceous, with two white stripes; abdomen blackish, testaceous at the base; femora and tibia with black tips; tarsi black, testaceous towards the base. Length of body 2 mm; of wings 4,5 mm. Mexico.

Se se refere as estrias brancas ao tarjado lateral do torax, as diferenças são poucas, limitando-se apenas ás pernas, onde a descrição sumaria combina sómente com o ultimo

Rüssel dunkel ockergelb, Palpen unten ebenso, jedoch im oberen Teile, der mit längeren ockergelben Haaren besetzt ist, braun werdend; Antennen ockergelb mit silberner Pubescenz; Clypeus, Stirn, Scheitel und Hinterkopf auf schieferfarbenem Grunde silberbestäubt und -behaart.

Thorax, oben orange, mit schmalen und langen goldglänzenden Schüppchen, unten mehr oder weniger bräunlich ockergelb; am Rande der Pleuren und den Lobuli prothoracici hat der Rückenschild einen breiten silberweissen Rand.

Abdomen, das erste Segment ockergelb mit randständigen silbernen Wimperhaaren, die andern gehen ins Braune oder Schwärzliche über.

Beine ockergelb mit ziemlich spärlichen Haaren und haarartigen Schüppchen, welche bald dunkel, bald hell sind; Spitzen der vordersten Tibia nur an der Rückseite gebräunt; das Spitzendrittel der hintersten Tibia und der ganze vorderste Fuss chocoladebraun; die Metatarsen der hinteren Paare mit den beiden oberen Dritteln weiss, ebenso das zweite Tarsalglied des mittleren Paares von oben bis ungefähr zur Mitte; der Rest des Fusses ist chocoladenbraun.

Flügel ohne auffallende Merkmale; Halteren mit bräunlich ockergelbem Stamm, das Capitulum von sehr blasser gelber Wachsfarbe.

Das Männchen unterscheidet sich durch die gewöhnlichen sexuellen und accessorischen Merkmale.

Die Augen sind beim Weibchen grün mit orangerot vermischt; beim Männchen herrscht letztere Farbe im oberen, grossfacettirten Teile vor.

Die Krallen des Weibchens haben einen kleinen Secundärzahn, der manchmal ziemlich schwer zu sehen ist; beim Männchen sind es deren zwei, ein heller und ein dunkler.

Die Nymphe hat je acht fadenförmige Athmungsröhren, die an je drei Hauptstämmen entstehen, von denen einer zwei, die anderen je drei Aeste abgeben.

Die Larve wird bei São Paulo in grosser Menge gefunden und zwar an denselben Orten, wie *Simulium venustum*, welches weniger

par. O abdome concorda perfeitamente com todos os nossos exemplares conservados, podendo todavia ser mais amarelo nos exemplares frescos. A decizão ultima desta questão de identidade dependerá da comparação com o tipo de WALKER ou com exemplares provenientes do Mexico.

8. *Simulium exiguum* n. sp. Côr geral preta; tamanho 1-1,5 mm.

Tromba preta, palpos e antenas tambem, os ultimos com pubecencia branca; o resto da cabeça preto, com pequenos pelos esbranquiçados.

Torax: escudo preto aveludado, com escamas douradas, mais abundantes na parte posterior; escutelo com pelos escuros, bastante compridos na marjem e escamas douradas abundantes; em cima o fundo é mais claro com reflexo mate.

Abdome côr de chocolate, com pelos palidos no primeiro segmento.

Pernas: primeiro par enfuscado, a tibia ocracea, coberta com escamas brancas estreitas; ha outras, mais largas, sobre fundo chocolate, no femur; segundo par em geral côr de chocolate, com escamas estreitas e compridas do lado exterior do femur e da tibia, o metatarso mais claro; terceiro par: metade bazal da tibia amarela, coberta de escamas de côr nivea; os dois terços bazais do metatarso aprezentam o mesmo aspeto; o resto da perna chocolate. Unhas inermes.

Azas, como de costume; as nervuras de côr pardacenta bastante clara; halteres de côr de cêra amarelada, bastante palida.

Tenho varios exemplares do Rio Grande perto de Franca.

9. *Simulium varians* n. sp. Côr geral preta, em parte alaranjada, tamanho total cerca de 1,5 mm.

Tromba chocolate, palpos tambem; antenas ocraceas na baze, do terceiro articulo em diante mais escuras e com pubecencia esbranquiçada; clipeo, fronte e vertice com brilho de chumbo.

Torax: em cima castanho escuro aveludado, com manchas alaranjadas de fórma variada; num cazo formam trez estrias lonjitudinais, reichlich auftritt. Die biologischen Beobachtungen beziehen sich auf diese beiden Arten.

Ich gebe hier noch die Beschreibung von *Simulium ochroceum* Walker (Ent. Soc. Lond. Trans. V, pg. 332; ich entnehme dieselben dem Buche von JOHANNSEN: *Aquatic nematocerous diptera* (Albany 1903), pg. 370.

«Female: Testaceous with white tomentum; head white; antennae testaceous; thorax ochraceous with two white stripes; abdomen blackish, testaceous at the base; femora and tibiae with black tips; tarsi blach, testaceous towards the base; wings vitreous; veins pale testaceous. Length of body 2 mm.; of wings 4,5 mm. Mexico.»

Wenn man die weissen Streifen auf den obenbeschriebenen Thoraxrand bezieht, sind die Unterschiede gering und betreffen hauptsächlich die Beine, wo die summarische Beschreibung nur beim letzten Paar ganz stimmt. Das Abdomen zeigt sich bei allen meinen conservirten Exemplaren übereinstimmend, kann jedoch in frischen Exemplaren mehr gelb sein. Die letzte Entscheidung über diese Identitätsfrage wird von einer Vergleichung mit dem Typus von WALKER oder aus Mexico stammenden Exemplaren abhängen.

8. *Simulium exiguum* n. sp. Allgemeinfärbung schwarz; Grösse 1—1,5 mm.

Rüssel und Palpen schwarz, Antennen ebenso, aber mit weisser Pubescenz; der Rest des Kopfes schwarz, mit weisslichen Härchen.

Thorax: Scutum sammtschwarz, mit schmalen goldenen Schüppchen, die im hinteren Teile dichter stehen: Schildchen am Rande mit ziemlich langen, randständigen dunklen Haaren und reichlichen goldenen Schüppchen, oben ist der Grund heller, mit mattem Schimmer.

Abdomen chocoladebraun, mit hellen Haaren am ersten Segment.

Beine: das erste Paar bräunlich, jedoch die Tibia ockergelb, mit schmalen weissen Schuppen besetzt; andere, etwas breitere, stehen am Schenkel auf braunem Grunde; zweites Paar im Ganzen chocoladefarben, mit schmalen und langen Schüppchen an der Aussenseite von Femur und Tibia, der Metatarsus heller; drittes Paar: Tibia an der oberen Hälfte gelb, mit

das quais a central é abreviada adiante e as laterais por traz; no outro ha uma larga faixa mediana e as marjens são largamente tarjadas da mesma côr; no terceiro a côr alaranjada se limita á marjem anterior e posterior; o resto do torax é preto com lijeiro brilho cinzento.

Abdome pardacento, com a baze, principalmente em baixo, tirando sobre o ocraceo escuro.

Azas, como na especie anterior; halteres alaranjados ou de amarelo pardacento pouco carregado; a baze dos pedunculos um pouco enfuscada.

Pernas em geral de côr ocracea, mais ou menos enfuscada; o femur anterior com escamas douradas sobre fundo ocraceo; a tibia, com a parte média mais clara, o resto do pé chocolate; no par médio a metade bazal da tibia e os dois terços bazais do metatarso com fundo ocraceo e escamas, ora alvacentas, ora de dourado palido; perna posterior com o femur coberto de escamas filiformes de um dourado palido; o metatarso é esbranquiçado, menos na face anterior e no terço apical que é chocolate, como o pé. As unhas parecem inermes.

Descrito de trez femeas apanhadas no Rio Grande, perto de Franca, Estado de S. Paulo.

Dou em seguida a reprodução da descrição dada por GOELDI, de especie amazonica que não póde ser identificada a uma das acima descritas.

10. *Simulium amazonicum* nov. spc. GOELDI (1905).

♀ «Imago: Colorido geral: ennegrecido. *Antennas* de 10 articulos, dos quais I e II (basaes) maiores, o ultimo (X) conico; colorido uniforme brunnaceo. *Thorax:* Lado dorsal, colorido dominante em cinzento azulado-prateado, no qual se destaca um desenho caracteristico de côr preta, com muitos lindos cabellos dourados pelo campo todo e principalmente pela margem exterior do desenho; este constitue-se: 1) de uma estria recta mediana 2) de duas linhas curvas, em fórma de semilua, combinando-se com a mediana, de maneira a formar mais ou menos um T, virado

schneeweissen Schüppchen; die oberen zwei Drittel des Metatarsus ebenso, der Rest des Beines chocoladebraun. Krallen ohne Zahn.

Flügel wie gewöhnlich; das Geäder von ziemlich heller bräunlicher Färbung; Halteren von ziemlich blasser gelblicher Wachsfarbe.

Ich besitze verschiedene Exemplare von Rio Grande bei Franca.

9. *Simulium varians* n. sp. Allgemeinfärbung schwarz, mit etwas Orange; Länge ca. 1,5 mm.

Rüssel und Palpen chocoladebraun, Antennen unten ockergelb, vom dritten Abschnitt an dunkler mit feiner weisslicher Behaarung; Clypeus, Stirn und Scheitel mit Bleiglanz.

Thorax oben sammtartig dunkelbraun, mit orange Flecken von wechselnder Form; in einem Falle bilden sie drei Längsbinden, von denen die mittlere vorn und die seitlichen hinten abgekürzt sind; im andern findet sich eine mittlere Binde und die Seiten des Scutums sind mit derselben Farbe breit gesäumt; im dritten Falle beschränkt sich das Orange auf den Vorder- und Hinterrand; der Rest des Thorax ist schwarz mit leichtem grauen Schimmer.

Abdomen bräunlich, der Basalteil besonders unten in dunkles Ockergelb übergehend.

Flügel wie bei der vorigen Art; Halteren orange oder leicht bräunlich gelb; Basalteil des Stieles etwas gebräunt.

Beine mehr oder weniger bräunlich ockergelb; vorderster Schenkel mit goldenen Schüppchen auf ockergelbem Grunde, Tibia mit hellerer Mittelpartie, der Rest des Beines braun; am mittleren Paare zeigen die Basalhälfte der Tibia und die oberen zwei Drittel des Metatarsus auf ockergelbem Grunde bald weissliche, bald hellgoldgelbe Schüppchen; das letzte Bein am Schenkel mit blass goldgelben Schüppchen; Metatarsus weisslich, ausgenommen an der Vorderseite und am Spitzendrittel, welche ebenso wie der Fuss chocoladebraun sind. Die Krallen scheinen unbewaffnet zu sein.

Die Beschreibung ist nach drei Weibchen, welche am Rio Grande, in der Nähe von Franca (Staat São Paulo) gefangen wurden.

Nachfolgend gebe ich die Uebersetzung der Beschreibung, welche GOELDI für eine Art

para frente. (Poderia-se assim fallar de 5 linhas thoracicas longitudinaes). *Pernas:* I. par: femur claro, (sómente o lado distal um pouco chamuscado) tibia toda e todo o tarso fuliginoso-escuro. II. par: clara em toda a extensão, com unica excepção talvez de serem um bocadinho chamuscadas todas as articulações, pelo lado distal, desde a tibio-tarsal; — III. par: escuro o femur, a metade distal da tibia, o ultimo quarto distal do tarso e o terço ou a metade distal dos outros articulos tarsaes. E' muito caracteristico o colorido das pernas, sobretudo o terceiro par bicolor. *Halteras* amarellas esbranquiçadas, contrastando fortemente com a côr escura do abdomen. *Azas:* bellamente irisantes, com matizes dourados: aliás moldadas conforme feitio e nervatura usuaes no genero Simulium.

(Vena cubital, com os seus dous ramos VII[1] e VII[2] assaz difficil de ver, mórmente a segunda). — *Abdomen* fuliginoso, aliás sem desenhos e marcas especiaes. — Dimensões: Comprimento total 2,06 mm. — Comprimento da antenna 0,35 mm. — Largura do thorax: 0,86 mm. — Comprimento do abdomen 1,12 mm. — Maior largura do abdomen 0,58 mm. — Comprimento da aza 1,6 mm. — Largura da aza 0,91 mm.

Muitos exemplares ♀ ♀ ♀ vindos de Teffé (coll. A. Ducke, Janeiro 1905), correspondendo inteiramente com numerosos individuos, colligidos no alto do *Rio Purús* e *Acre* (Dr. J. HUBER e commissão do Museu 1904—1905) e conservados em alfinetes e no alcool.»

Quando este trabalho já estava quazi terminado recebi o n.º 2 da *Zeitschrift für wissenschaftliche Insektenbiologie* (de Berlim), na qual SCHROTTKY descreve trez especies de *Simulium* do Paraguay. Parece tratar-se de duas especies novas que poderão ser encontradas em territorio brazileiro, razão pela qual dou aqui a tradução das descrições; quanto a terceira (n.º 1) desconfio tratar-se apenas do *Simulium venustum.*

Descrição orijinal:

«1. *Simulium inexorabile* n. sp.

Cabeça e torax preto com pó cinzento; abdome, em cima, cinzento de ardozia, mais escuro no meio dos segmentos, em baixo todo vom Amazonas gegeben hat, die sich mit keiner der obigen identificiren lässt:

10. *Simulium amazonicum* nov. spec. — (GOELDI 1905).

Imago: Allgemeinfärbung schwärzlich. — Antennen mit 10 Gliedern, von denen I und II (die basalen) grösser sind; der letzte (X) ist conisch; Färbung gleichmässig bräunlich. Thorax: Dorsalseite mit vorherrschend bläulich-grauer Färbung, von welcher sich eine characteristische Zeichnung in schwarzer Farbe abhebt, mit vielen hübschen, goldenen Härchen im ganzen Gesichtsfelde und besonders am äusseren Rande der Zeichnung; diese besteht: 1) aus einem geraden Mittelstreifen, 2) aus zwei gebogenen Linien in Form eines Halbmondes, die sich derart mit der mittleren verbinden, dass sie mehr oder weniger ein nach vorn gewandtes T bilden. (Man könnte so von fünf Längsstreifen auf dem Thorax sprechen.) — Beine: erstes Paar: Schenkel hell (nur die Distalseite etwas geschwärzt), die ganze Tibia und der ganze Tarsus dunkel russbraun. Zweites Paar in seiner ganzen Länge hell, vielleicht mit der einzigen Ausnahme, das alle Gelenke, vom Tibio-tarsalgelenk an, auf der distalen Seite wie ein wenig angesengt erscheinen; drittes Paar: Femur, distale Hälfte der Tibia, das letzte distale Viertel des Tarsus und distales Drittel oder Hälfte der anderen Tarsalglieder dunkel. Die Färbung der Beine ist sehr characteristisch, besonders das zweifarbige dritte Paar. Halteren: weisslichgelb, von der dunklen Farbe des Abdomens stark abstechend. — Flügel schön irisirend, mit goldenen Nuancen; sonst verhalten sich Form und Geäder wie gewöhnlich im Genus Simulium.

(Cubitalvene, mit den Aesten VII[1] und VII[2] ziemlich schwer zu erkennen, besonders der zweite). — Abdomen russbraun, sonst ohne besondere Flecken oder Zeichnungen. — Dimensionen: Gesamtlänge 2,06 mm. — Länge der Antennen 0,35 mm. — Breite des Thorax 0,86 mm. — Länge des Abdomens 1,12 mm. — Grösste Breite des Abdomens 0,58 mm. — Länge des Flügels 1,6 mm. — Länge des Flügels 0,91 mm.

Viele Exemplare ♀ ♀ ♀ von Teffé (Coll. A.

cinzento claro. Olhos (no animal vivo) verdes; palpos pretos, o articulo bazal esferico, coberto do lado interno com pêlos compridos; o segundo articulo um pouco mais curto que o primeiro, os dois que se seguem trez vezes mais compridos do que largos, em fórma de clava, o articulo apical comprido e filiforme. Antenas pardo-claras, em cima, com exceção dos ultimos dois a trez articulos, pardo escuras; primeiro articulo esferico, segundo tão comprido como o primeiro e com corôa apical de pelos pequenos e finos. 3 pouco menor que o 2, 4 a 10, em forma de disco, a largura mais que dupla do comprimento, 11 ponteagudo. Torax coberto de pelos escassos e muito curtos de amarelo de ouro; azas com brilho irizante intenso, halteres brancos. Pernas: I. femur amarelo pardacento, tibia branca amarelada, com o apice escuro, tarsos pretos. II. amarelo pardacento com tarsos pardo-escuros. III. femur amarelo pardacento, tibia branca na metade bazal, pardo escura na distal, metatarso branco, os outros articulos tarsais quazi pretos. O primeiro segmento abdominal com pelos amarelos de ouro na marjem, os outros segmentos canelados com depressões lonjitudinais paralelas. Comprimento 3 mm., excepcionalmente até 5 mm.

2. *Simulium paranense* n. sp.

Côr do corpo preto aveludado, os articulos das antenas 1 a 3 pardo amarelados, os outros pretos; os olhos (no animal vivo) verde pardacento; as antenas mais curtas e grossas que na especie anterior, os articulos dos palpos mais curtos e visgozos. Pernas: I. tibia, metatarso e a baze do articulo tarsal seguinte brancos, o resto preto. II. preto, metatarso branco, o ultimo quinto preto; articulo seguinte branco na baze, preto no apice. III. preto, metatarso branco, o ultimo terço preto; o articulo seguinte metade branco, metade preto; as azas hialinas e irizantes, os halteres brancos. No abdome não ha vestijio de canelação. Comprimento $2^1/_2$ mm.

Paraguay (alto Paraná), talvez mais espalhado.

3. *Simulium paraguayense* n. sp.

Na coloração parecido com *S. inexorabile*, Ducke, Januar 1905), vollständig übereinstimmend mit zahlreichen Individuen, welche am oberen Rio Purús und Acre (Dr. J. Huber und Museumscommission 1904/05) gesammelt und gespiesst oder in Alcohol conservirt wurden.

Als diese Arbeit schon beinahe abgeschlossen war, erhielt ich Nummer 2 der Zeitschrift für wissenschaftliche Insektenbiologie von Berlin, in welcher Schrottky drei Arten von *Simulium* aus Paraguay beschreibt. Es scheint sich um zwei neue Arten zu handeln, die wohl auch auf brasilianischem Gebiet gefunden werden könnten, wesshalb ich hier die Beschreibungen im Originale reproduziere: was die dritte (No. 1) anbetrifft, so hege ich den Verdacht, dass es sich vielleicht bloss um *Simulium venustum* handeln könnte.

Nachstehend Originalbeschreibung der Arten von Schrottky.

«1. *Simulium inexorabile* n. sp. (Say) *S. venustum.*

♀ Kopf und Thorax schwarz, grau bereift; Abdomen oben schiefergrau, in der Mitte der Segmente dunkler, unten ganz hellgrau. Augen (beim lebenden Tiere) grün; Palpen schwarz, das Basalglied kugelförmig, innen mit langen Haaren besetzt, das zweite Glied etwas kleiner, als das erste, die nächsten beiden je drei Mal so lang als breit, keulenförmig, das Apicalglied lang und fadenförmig. Antennen hellbraun, oben, mit Ausnahme der ersten 2—3 Glieder, dunkelbraun; 1. Glied kugelförmig, 2. so lang als das erste und apikal mit einem Kranz feiner Härchen, 3. nur wenig kleiner als 2., 4.—10. scheibenförmig, mehr als doppelt so breit als lang, 11. spitz. Thorax mit spärlichen, ganz kurzen, goldgelben Härchen besetzt; Flügel lebhaft irisirend, Halteren weiss. — Beine: 1. Femur bräunlichgelb, Tibia gelbweiss mit dunklem Apex, Tarsus schwarz; II. bräunlichgelb mit dunkelbraunen Tarsen; III. Femur bräunlichgelb, Tibia in der basalen Hälfte weiss, in der distalen dunkelbraun; Metatarsus weiss, übrige Tarsenglieder fast schwarz. Das erste Abdominalsegment mit goldgelben Haaren bewimpert, die übrigen Segmente längsgerieft. Länge 3 mm., ausnahmsweise bis 5 mm.

Paraguay, Argentinien, Brasilien am Paranástrom.

podendo ser diferenciado não só pelo tamanho menor, mas tambem imediatamente pelo abdome não canelado e pelo ultimo articulo das antenas, o qual no *Simulium paraguayense* não é ponteagudo mas quadrangular, tambem comparativamente muito maior. Os olhos (no animal vivo) são furta-côres, vermelho de cobre para verde. O torax é coberto com pelos pequenos de côr verde dourado; as azas são hialinas, os halteres esbranquiçados. Pernas: I. femur e tibia pardo-amarelados, tarso preto. II. pardo-amarelado com tarsos mais claros. III. femur e tibia pardo-amarelados com apice pardo-escuro, tarsos esbranquiçados, os articulos terminais mais escuros. Comprimento 2 mm.

Paraguay, Argentina no Rio Paraná, sómente na vizinhança imediata do rio.»

M. E. ROUBAUD *(Comptes Rendus d. s. de l'Acad. des Sc.,* pg. 519) divide o genero *Simulium* em dous sub-generos bazeados na formação do segundo tarso posterior e outros caracteres. Eis a sua definição.

«Le deuxième article des tarses postérieurs dans les deux sexes, allongé, linéaire, sans échancrure basilaire. Cases pupales agrégées, imparfaites. Un très-grand nombre de filaments nymphaux... S. G. I. *Pro-Simulium* E. ROUBAUD.

Le deuxième article des tarses postérieurs court, arqué, échancré dorsalement, à sa base, dans les deux sexes. Cases pupales solitaires parfaites. Filaments nymphaux en général peu nombreux... S. G. II. *Eu-Simulium.*»

Este sub-genero segundo o autor tambem tem o metatarso mais diferenciado: «Chez ces derniers en effet, l'organe présente distalement une expansion en forme de palette, qui protège la base du deuxième tarsien sur une longueur en général notable». Nas nossas especies este carater, ás vezes, como no *S. venustum* e *rubrithorax,* é bem acuzado, outras vezes, pouco, como no *S. perflavum;* em *S. nigrimanum* falta quazi completamente, mas a forma do segundo tarso sempre corresponde aos caracteres do sub-genero. Tambem a in-

2. *Simulium paranense* n. sp.

Körperfärbung sammetschwarz, die Antennenglieder 1-3 gelbbraun, die übrigen schwarz; die Augen (beim lebenden Tiere) bräunlichgrün; die Antennen sind gedrungener als bei der vorigen Art, die Palpenglieder kürzer und klobiger. Beine: I. Tibie, Metatarsus und die Basis des nächsten Tarsalgliedes weiss, der Rest schwarz; II. schwarz, Metatarsus weiss, das letzte Fünftel schwarz; das nächste Glied basal weiss, apikal schwarz; III. schwarz, Metatarsus weiss, das letzte Drittel schwarz; das nächste Glied halb weiss, halb schwarz; die Flügel sind hyalin und irisirend, die Halteren weiss. Am Abdomen keine Spur von Riefelung. Länge 2 $^1/_2$ mm.

Paraguay (Alto Paraná), vielleicht ebenfalls weiter verbreitet.

3. *Simulium paraguayense* n. sp.

In der Färbung ähnlich *S. inexorabile,* von dieser jedoch ausser durch die geringere Grösse sofort durch das nicht geriefte Abdomen, sowie das letzte Antennenglied zu unterscheiden, welches bei *S. paraguayense* nicht spitz, sondern viereckig, auch im Verhältniss bedeutend grösser ist. Die Augen sind (beim lebenden Tiere) kupferrot-grün schillernd. Der Thorax ist mit goldiggrünen Härchen besetzt; die Flügel sind hyalin, die Halteren weisslich; Beine: I. Femur und Tibie gelbbraun; Tarsus schwarz, II. gelbbraun mit helleren Tarsen, III. Femur und Tibie gelbbraun mit dunkelbraunem Apex, Tarsen weisslich, die Endglieder dunkler. Länge 2 mm.

Paraguay, Argentinien am Alto Paraná, nur in nächster Nähe des Flusses.»

M. E. ROUBAUD (*Comptes Rendus* d. s. *de l'Acad. des Sc.,* pg. 519) zerlegt das Genus *Simulium* in zwei Subgenera, die sich auf die Bildung des letzten zweiten Tarsalgliedes und andere Charactere gründen. Hier folgt seine Definition:

«Le deuxième article des tarses postérieurs dans les deux sexes, allongé, linéaire, sans échancrure basilaire. Cases pupales agrégées, imparfaites. Un très-grand nombre de filaments nymphaux . . . . . ., S. G. I. *Pro-Simulium* ROUBAUD.

Le deuxième article des tarses postérieurs

cizura dorsal é sempre prezente, ás vezes, pouco conspicua.

Durante a impressão do prezente trabalho chegou uma remessa de borrachudos, feita pelo Dr. GURGEL DO AMARAL. Procedia de *Alfenas,* no Sul de *Minas,* perto de um afluente do *Rio Grande.* De acôrdo com este fato continha um grande numero de exemplares de *S. exiguum* n. sp. sendo o resto formado por *S. nigrimanum* MACQ. Da primeira especie havia tambem dous machos, mal conservados e não mostrando nada de extraordinario.

Outra coleção foi feita pelo Dr. ARTHUR NEIVA no salto de *Itapura* perto da confluencia do *Tieté* com o *Paraná.* Continha um exemplar de *S. perflavum* ROUB. e alguns de *S. nigrimanum* MACQ. sendo tambem reprezentado (ao que me parece) o *S. venustum* SAY. O maior numero de exemplares pertencia a uma especie menor que combina bem com o *S. paraguayense* SCHROTTKY. Pertence ao subgenero *Eusimulium* e tem unhas com pequeno dente bazal pouco conspicuo.

Durante este tempo tambem verifiquei a existencia do *Simulium perflavum* no Rio de Janeiro. No Rio Tijuca as larvas e ninfas desta especie são encontradas em grande numero.

court, arqué, échancré dorsalement à sa base, dans les deux sexes. Cases pupales solitaires, parfaites. Filaments nymphaux en général peu nombreux . . . . . S. G. II. *Eu-Simulium* ROUBAUD.»

Die von mir beschriebenen Arten gehören zu dem Subgenus *Eusimilium*, bei welchem nach dem Autor auch der Metatarsus mehr differenzirt ist: «Chez ces derniers en effet, l'organe présente distalement une expansion en forme de palette, qui protège la base du deuxième tarsien sur une longueur en général notable.» — Bei unseren Species ist dieses Merkmal manchmal sehr ausgeprägt, wie bei *S. venustum* und *rubrithorax*, andere Male weniger, wie bei *S. perflavum.* Bei *S. nigrimanum* fehlt er fast völlig, aber die Form des zweiten Tarsus entspricht immer den Characteren der Untergattung. Auch die dorsale Incisur ist immer vorhanden, obwohl manchmal nicht sehr auffällig.

Nachtrag: Während des Druckes der vorstehenden Arbeit wurden noch Simulien von Dr. GURGEL DO AMARAL eingesandt. Dieselben stammten aus *Alfenas*, im Süden des Staates *Minas* und im Zuflussgebiet des *Rio Grande.* Dementsprechend fanden sich auch darunter zahlreiche Exemplare von *S. exiguum* n. sp., während der Rest aus *S. nigrimanum* MACQ. bestand. Von ersterer Art waren auch zwei schlecht erhaltene Männchen vorhanden, die nichts Auffallendes zeigten.

Eine andere Sammlung machte Dr. ARTHUR NEIVA am Wasserfalle von *Itapura*, nahe der Vereinigung des *Tieté* mit dem *Paraná.* Dieselbe enthielt ein Exemplar von *S. perflavum* ROUB. und mehrere von *S. nigrimanum* MACQ. Auch *S. venustum* SAY schien vertreten. Das Hauptcontingent wurde aber von einer kleineren Art gestellt, welche mit *S. paraguayense* SCHROTTKY gut übereinstimmt. Sie gehört zum Subgenus *Eusimulium* und hat Krallen mit kleinem oft schwer erkennbarem Basalzahne.

Unterdessen hatte ich auch Gelegenheit, *Simulium perflavum* in Rio de Janeiro nachzuweisen. Die Larven und Nymphen finden sich sehr reichlich im Rio Tijuca.

Estudos sobre a Variola

pelos

Drs. S. von Prowazek e H. de Beaurepaire Aragão

(Com 2 figuras no texto e estampas N. 7 e 8)

Variola-Untersuchungen

von

Dr. S. von Prowazek und Dr. H. de Beaurepaire Aragão

(Mit 2 Textfiguren und Tafel 7 u. 8)

A epidemia da variola no Rio, em 1908, nos proporcionou a oportunidade de fazer estudos sobre o virus produtor dessa molestia. Os rezultados das pesquizas então feitos foram rezumidamente publicados no «Münchner Medizinische Wochenschrift», n.º 44, 1908. A fórma aforistica do comunicado deu lugar a equivocos, pelo que nos decidimos a voltar ao assunto de maneira mais minucioza.

I. O produtor da variola

Para que podessemos abordar mais de perto a questão do ajente produtor da variola fizemos em primeiro lugar estudos de orientação sobre a *filtrabilidade* do virus, e assim pudemos nos convencer que o virus de pustulas recentes, desde que não esteja de mistura com grande cópia de detritos celulares, que, além de obstruir os póros, absorvem o virus atravessam os filtros de papel espesso, asbesto, BERKEFELD e UHLENHUTH. Com os filtrados assim obtidos conseguimos sempre inoculações pozitivas na cornea de coelhos. A cornea inoculada era cuidadozamente retirada, ao cabo de 48 hóras, fixada com o sublimado-alcool, incluida em parafina, e os córtes córados, no mais das vezes com a he-

Während der Variola-Epidemie in Rio 1908 bot sich uns die Gelegenheit dar, uns mit dem Virus der Variola eingehend zu beschäftigen; die damals gemeinsam gewonnenen Resultate der Untersuchung wurden vor kurzem in der Münchner medizinischen Wochenschrift (Nr. 44, 1908) publiziert. Die aphoristische Form der Mitteilung hat jedoch zu Missverständnissen Anlass gegeben und so haben wir uns entschlossen, nochmals in ausführlicher Weise über das genannte Thema Bericht zu erstatten.

I. Der Erreger der Variola

Um der Frage nach dem Erreger der Variola näher zu kommen, wurden in erster Reihe zur Orientierung verschiedene *Filtrationsversuche* mit dem Virus angestellt und wir konnten uns zunächst davon überzeugen, dass frisches Pustelvirus, das nicht mit übermässig viel Zelldetritus vermischt ist, wodurch begreiflicherweise die Poren des Filters bald verstopft werden und auch das Virus absorbiert wird, in den meisten Fällen dicke Papierfilter, Asbest-, BERKEFELD- und UHLENHUTH-Filter passiert. Wir konnten mit diesen derart gewonnenen Filtraten jederzeit positive Im-

matoxilina ferrea de HEIDENHAIN. Na maioria dos cazos puderam ser caraterizados os *corpusculos de Guarnieri,* tipicos da variola.

Esforçámo-nos por libertar, tanto quanto possivel o virus do sôro e da albumina, lavando-o radicalmente por muito tempo, o que simultaneamente, o enriquecia. Para isso conseguir, a exemplo do que já havia sido feito com o virus da *Hühnerpest,* filtrámos o material fresco atravez de camadas coloidais (agar a 3 %). Foi observada a seguinte tecnica: Um filtro de papel bem molhado com agua fiziolojica era colocado no interior dum pequeno funil a cujas paredes era fixado por um cone de platina e tornado aderente a ellas por meio da aspiração exercida pela trompa d'agua. Por 3 ou 4 vezes; sobre o filtro era lançado o agar de maneira a todo o papel ficar por elle impregnado e que um pequeno depozito do material se acumulasse no fundo. Condição capital para o sucesso da filtração é que o agar impregne igualmente toda superficie do filtro de papel, sem que se formem lacunas. Impregna-se o filtro, lançando sobre elle certa porção de agar liquefeito, girando o aparelho em pozição horizontal, de maneira que o coloide se solidifique, formando tenue camada.

Apóz solidificação do agar, lança-se sobre o filtro o filtrado, já a algum tempo obtido pela passajem atravéz do papel de material de pustulas, um pouco diluido em agua fiziologica e deixa-se filtrar por aspiração lenta durante 1 á 3 hóras. (Fig. 1).

A filtração deve ser acompanhada cuidadozamente e sob continua vijilancia, porquanto apóz a passajem das ultimas porções de liquido a camada coloidal facilmente se fende e, nesse cazo, o filtrado é inutilizavel. O tenue depozito obtido sobre a massa de agar é estendido para preparados em laminas com uma alça de platina; são estes desecados, privados do resto de sôro por lavajens sucessivas com agua distilada, de novo desecados e fixados durante algumas hóras em alcool absoluto e córados com a fucsina anilinada de LOEFFLER.

Para se obter maiores porções de filtrados procedeu-se, segundo os conselhos de GIEMSA, do seguinte modo:

pfungen an der Kaninchenkornea vornehmen. Die geimpfte Kornea wurde nach 48 Stunden sorgfältig herausgenommen, in Sublimatalkohol fixiert, in Paraffin eingebettet und die Schnitte in den meisten Fällen mit HEIDENHAINS Eisenhämatoxylin gefärbt. In der Mehrzahl der Fälle wurden in den Schnitten die auch für die Variola typischen GUARNIERI'schen *Körperchen* nachgewiesen.

Unser Bestreben ging aber dahin, das Virus möglichst von dem Serum und dem Eiweiss zu befreien, es längere Zeit gründlich zu waschen und gleichzeitig in grösseren Mengen anzureichern. Zu diesem Zwecke filtrierten wir das frische Material nach Analogie der Filtrationsversuche bei der Hühnerpest durch Kolloidschichten (Agar-Agar 3 %). Es wurde folgende Versuchsanordung getroffen: Ein mit physiologischer Kochsalzlösung benetzter Filterpapiertrichter wurde mit Hilfe eines Platinkonus in einen kleinen Glastrichter dicht durch Ansaugen mit einer Wasserstrahlpumpe sorgfältig eingefügt und dann 3—4 mal mit Agar-Agar derart durchtränkt, dass die Substanz überall den Papierrand überdeckte und an der Basis einen kleinen Agarschichtkegel bildete. Ein Haupterfordernis für gute Filtrationsresultate ist, dass die Agarsubstanz gleichmässig den Papiertrichter durchtränkt und lückenlos bedeckt; bei der Durchtränkung verfährt man derart, dass man den flüssigen Agar jedesmal aus dem Trichter, den man in horizontaler Lage rotiert, hinausgiesst und den geringen Rest des Kolloids in Form einer dünnen Schicht erstarren lässt.

Nach dem Erstarren des Agars wurde nach einiger Zeit das vorher durch Papier filtrierte, etwas mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Pustelmaterial unter mässigem Druck langsam in 1-3 Stunden hindurchfiltriert. (Textfigur 1).

Die Filtration muss vorsichtig unter steter Kontrolle erfolgen, weil nach dem Passieren der letzten Flüssigkeitsmenge die Kolloidgallertschicht des Agarkegels sich leicht spaltet und das Filtrat unbrauchbar wird. Der leichte Belag des Agarkegels wurde dann mit der Platinöse zu Ausstrichen verarbeitet, diese wurden hierauf getrocknet, der Serumrest

Impregnou-se repetidas vezes de agar uma vela PUKAL cortada, de maneira que, apoz solidificação do coloide, se formasse no interior della tenue e regular camada, atravez a qual se fez a filtração. Por intermedio de rolha de borracha perfurada era a vela unida a um tubo de vidro capilar de paredes espessas e que entrava no interior de um frasco de filtração. O denominado ultra filtrado é recebido em tubo de ensaio esteril. (Fig. 2).

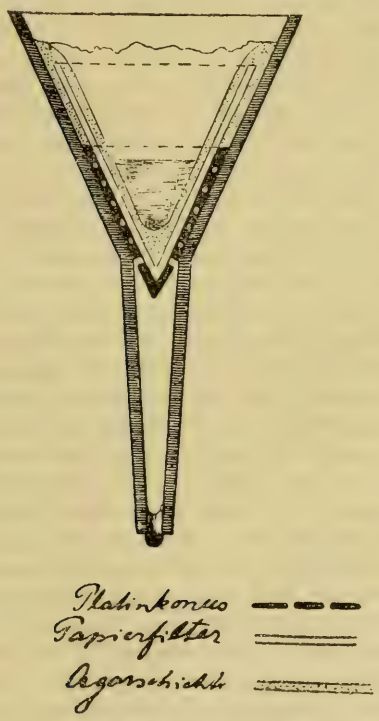


Fig. 1

Para que se obtivesse material livre de bacterios, era em alguns cazos, o conteúdo das pustulas diluido e passado atravez a vela de BERKEFELD e, assim, maior porção desse filtrado era reduzida com o filtro de coloide acima referido. Por egual processo podia-se conseguir vacina livre de bacterios. Para este fim é mister previamente triturar com cuidado o material de vacina, diluil-o, passal-o atravez um filtro de BERKEFELD e concentral-o finalmente em filtros de coloide. Em todos os cazos que pesquizámos pudémos

durch Einlegen oder Uebergiessen von Aqua destillata entfernt, abermals getrocknet, dann mehrere Stunden in Alkohol absolut fixiert und nach LÖFFLER mit Anilinfuchsin gefärbt.

Um grössere Mengen des Filtrates zu erhalten, verfuhr man nach dem Vorschlage von GIEMSA in folgender Weise: Eine abgeschnittene PUKAL-Filterkerze wurde mit Agar-Agar mehrere Male in der Weise ausgegossen, dass nach dem Erstarren des Kolloids innen eine dünne, gleichmässige Agarschicht entstand, durch welche das Virus hernach durchfiltriert wurde. Durch einen geeignet durchbohrten Gummipfropfen wurde die derart ausgegossene Kerze mit einem dickwandigen Kapillarrohr verbunden, das in das Innere einer Filtrationsflasche hineinragte. Das sogenannte

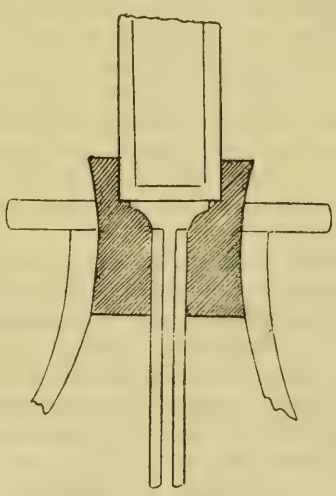


Fig. 2

Ultrafiltrat wurde in einem sterilen Reagensrohr aufgefangen. (Textfig. 2). Um bakterienfreies Material zu erhalten, wurde in einigen Fällen der verdünnte Inhalt der Pocken zuerst durch BERKEFELD-Filter filtriert und dann grössere Mengen dieses Filtrats in den oben geschilderten Kolloidfiltertrichtern eingeengt und untersucht. Auf diese Weise könnte man auch eine bakterienfreie Vaccine gewinnen. Zu diesem Zwecke ist es notwendig, das Vaccinematerial vorher sorgfältig zu zerreiben und dann verdünnt durch BERKEFELD-Filter zu fil-

verificar nos preparados córados pelo LOEFFLER corpusculos redondos, extremamente pequenos, nitidamente diferenciados, córados de vermelho escuro e que, ás vezes, se dividiam sob a fórma de *diplococos*. Eram *menores* que as menores fórmas bacterianas até hoje conhecidas. Os corpusculos da variola multiplicam-se por uma especie de bipartição depois de certo aumento de tamanho. Não tomam o GRAM; córam-se pela fucsina de ZIEHL, pela eozina-azur de GIEMSA e pela tionina. Contrariamente ao que se verifica com os estreptococos e com os nucleos dos leucócitos não se córam, mesmo apoz longo contato com o *Neutralrot* ou *Brillantkresylblau*. No estado vivo mostram-se sob fórma de pontos pequenissimos que refratam moderadamente a luz (brilhantes). Como foram estes corpos encontrados recentemente por nós, em material de variola, assim como foram elles obtidos no filtrado das velas de BERKEFELD, concentrado num filtro de coloide, com excluzão de outra qualquer fórma microbiana, e, como, com este produto obtinhamos com sucesso a inoculução da cornea de coelho, julgamo-nos autorizados a consideral-os como *microbios da variola*.

Quando efetuámos essas pesquizas já existiam sob o mesmo assunto, 3 trabalhos que se podiam relacionar com as nossas observações, de CASAGRANDI, VOLPINO e de PASCHEN. Sobre a questão de serem todas as figuras vistas identicas, diremos apenas algumas palavras, porquanto VOLPINO «(Zentralblatt f. Bakt.», Bd. 49, H. 2) já enfeixou em um artigo de sinteze os carateres de todos os corpusculos até hoje observados na variola. Julgamos que, sobretudo, se deve pôr em cotejo os corpusculos descritos por VOLPINO e PASCHEN. Nossos corpusculos assemelham-se mais, no que respeita fórma e aspeto aos descritos por VOLPINO. As caracteristicas dadas por VOLPINO concordam essencialmente com as do nosso descobrimento, a não ser que não encontrámos nos nossos corpusculos grandes movimentos comparaveis aos que se observam nos infuzorios e flajelados. Não negamos, comtudo, a existencia de certo movimento nos corpusculos em questão.

trieren und zum Schluss etwa in Kolloidsäcken einzuengen.

In allen von uns untersuchten Fällen konnten in den nach LÖFFLER gefärbten Präparaten kleinste, vollkommen scharf differenzierte, dunkelrot gefärbte, rundliche Körperchen, die sich zuweilen in *Diplokokkenform* teilten, nachgewiesen werden. Sie waren *kleiner* als die kleinsten bisher bekannten Bakterien. Die Variolakörperchen vermehren sich durch eine Art von Zweiteilung und nehmen vorher etwas *an Grösse zu*. Sie färben sich nicht nach GRAM, nehmen jedoch die Färbung mit Fuchsin nach ZIEHL, GIEMSA'S Eosin-Azur und Thionin an. Im Gegensatz zu den Streptokokken und den Kernen der Leucocyten färben sie sich selbst nach längerer Einwirkungszeit nicht mit Neutralrot oder Brillantkresylblau. Während des Lebens stellen sie winzige, mässig lichtbrechende (schimmernde) Punkte dar. Da wir sie nur in dem Pockenmaterial *konstant* gefunden haben, sowie da sie auch in den auf Kolloidschichten eingeengten Berkefeldfiltraten allein ohne irgend welche weitere Mikroorganismen vorkamen und wir mit diesen Filtraten die Kaninchenkornea mit Erfolg impfen konnten, sprechen wir sie als *Erreger der Variola* an.

Zu der Zeit als unsere Untersuchungen angestellt wurden, lagen über ähnliche Befunde, die allein mit unseren Beobachtungen in Beziehung gebracht werden können, drei Arbeiten und zwar von CASAGRANDI, VOLPINO und PASCHEN vor. Ueber die Frage, ob alle diese Gebilde miteinander identisch sind, können wir uns derzeit kurz fassen, da VOLPINO (Zentralblatt f. Bakt., 49. Bd., H. 2) alle die Merkmale der verschiedenen bis jetzt gefundenen Körperchen in einer zusammenfassenden Uebersicht dargestellt hatte. In Betracht scheinen uns besonders die Körperchen, die VOLPINO und PASCHEN beschrieben haben, zu kommen. Unsere Körperchen sind zunächst bezüglich des Aussehens und der Grösse den Körperchen von VOLPINO am ähnlichsten; die Merkmale, die VOLPINO angibt, stimmen wesentlich mit den von uns gefundenen überein, nur dass wir nicht eine grosse Beweglichkeit der Körperchen, etwa nach Art der Flagellaten und Infusorien annehmen kön-

tão, movimento analogo ao das granulações de pigmento dos parazitos da malaria por ocazião da formação dos flagelos. Os corpusculos que PASCHEN foi o primeiro a descrever na vacina e dos quais tivémos para comparação um preparado (de corpusculos da variola) são relativamente aos nossos, um pouco maiores ($^1/_2$ μ), diferença esta que PASCHEN atribue aos metodos de coloração. No começo, acreditavamos numa diferença de tamanho de virus variolozo, em relação ao vacinico; agóra, porém, já não pensamos desse modo. Qual foi o primeiro a observar os verdadeiros corpusculos, é questão hoje dificil de dicidir, por isso que para diferenciação delles quazi não existem carateristicas *morfolojicas* e as dimensões variam conforme a coloração, (PASCHEN) o modo de se fazer a preparação ou estado de conservação do material. Os corpusculos descritos, em primeiro lugar, por PROWAZEK, como corpusculos iniciais consideramol-os como estádios de dezenvolvimento do virus; PASCHEN foi o primeiro a *descrever,* de modo *indubitavel,* corpusculos menores que esses.

Os corpusculos acima descritos reprezentam como já dissemos, apenas o estádio *vejetativo* do virus variolico. Inoculando-se esse virus na cornea de coelhos, ás vezes, foram tornadas viziveis no protoplasma das celulas epiteliais figuras maiores, em via de multiplicação e que são identicas aos corpusculos iniciais anteriormente descritos. Estes ultimos estádios de dezenvolvimento acham-se incluidos, nos primeiros periodos da infeção nos *corpusculos* de GUARNIERI. e, nos córtes bem sucedidos, córados pela hematoxilina ferrea, azul VICTORIA, violeta de genciana, eozina-azur de GIEMSA, patenteam-se sob a fórma de corpusculos fortemente córados, arredondados ou alongados no interior duma especie de vacuolo dos *corpusculos* de GUARNIERI. Nelles, como já anteriormente foi referido, nota-se um certo movimento ocilatorio.

A subsequente transmutação dessa figura em *corpusculos* de GUARNIERI não foi verificada com segurança.

Os preparados de pustula variolica fixados humidos pelo sublimado alcool e córados

nen. Wir leugnen jedoch nicht eine Beweglichkeit der fraglichen Körperchen, die etwa der Bewegung der Pigmentkörner bei der Geisselung eines Malariaparasiten gleichkommt. Die Körperchen, die PASCHEN zuerst bei Vaccine beschrieben hatte und von denen uns ein Präparat von Variolakörperchen zum Vergleiche zur Verfügung stand, schienen uns im Verhältnis zu unseren Variolakörperchen etwas grösser zu sein ($^1/_2$ μ) doch meint PASCHEN, dass die Grössenunterschiede nur aus der Methode der Färbung zu erklären sind. Wir dachten anfangs an eine Grössenvariation des Variolavirus im Verhältnis zur Vaccine, doch haben wir diesen Standpunkt jetzt aufgegeben. Wer zuerst die eigentlichen Körperchen gesehen hatte, lässt sich jetzt schwer entscheiden, da für die Beurteilung der Erreger uns zunächst so gut wie keine *morphologischen* Merkmale zur Verfügung stehen und die Grössendimensionen je nach Färbung (PASCHEN), Präparation und Erhaltungszustand *schwanken.* Die zuerst von PROWAZEK beobachteten Initialkörperchen sehen wir als Entwicklungsstadien des Virus an; kleinere Körper als diese hat *zuerst* PASCHEN in *unzweideutiger* Weise beschrieben.

Die oben geschilderten Körperchen stellen, wie schon bemerkt, nur das *vegetative* Stadium des Variolavirus dar. Durch Verimpfen des Virus auf die Kaninchenkornea wurden in einigen Fällen im Protoplasma der Epithelzellen grössere, in Vermehrung begriffene Gebilde sichtbar gemacht, die mit den früher beschriebenen Initialkörperchen identisch sind. Die letzteren Entwicklungsstadien werden von den GUARNIERI'*schen Körperchen* auf der ersten Stufe der Infektion eingeschlossen und sind in günstigen Schnitten, die mit Eisenhämatoxylin, Viktoriablau, Gentianaviolett oder GIEMSA'S Eosin-Azur gefärbt wurden, als dunkel gefärbte, runde oder längliche Körperchen in einer Art von Vakuole des GUARNIERI'*schen* Körperchens beobachtet worden. Von ihnen wurde früher angegeben, dass sie unter Umständen eine oscillierende Bewegung ausführen.

Die weiteren Transmutationen dieser Gebilde im GUARNIERI'*schen Körperchen* sind noch nicht mit Sicherheit erforscht worden.

depois pela hematoxilina mostram, ao lado de muitos leucócitos poli-nucleares, ás vezes, corpos ovalares ou redondos intensamente córados e que não são mais que restos dejenerados de nucleos de leucócitos poli-nucleares. Entre esses corpos e os nucleos dos leucócitos que morrem, encontram-se todos os estádios intermediarios.

Para a interpretação dos *corpusculos* de GUARNIERI como produto de reação da celula e, mórmente, do componente plastinico do nucleo é de interesse assinalar o fato de que, nem em todos os cazos elles se assestam junto dos nucleos, como figuras independentes, mas, muitas vezes só se verifica o aumento de volume dos nucleolos. Em um cazo em que se inoculou virus variolico com sôro de variolozo de 21 dias, não se formaram *corpusculos* de GUARNIERI intraplasmaticos, mas, em compensação, os nucleolos do nucleo estavam de tal fróma aumentados que se impunham como *corpusculos* de GUARNIERI. Apoz inoculação de vacina na palpebra interna do *Gecko* póde-se verificar um aumento dos nucleolos. Respeito á biolojia do produtor da vacina consignemos aqui os seguintes fatos: o virus morre apoz um contato de 20 hóras com a saponina, bile, tauro colato e oleato de sodio; pela ação da lecitina, marca *Agfa,* seguida de $^3/_4$ de hóra de centrifugação e sedimentação de 4 hóras, obtem-se sobre a cornea de coelho apenas uma reação limitada inteiramente local. Nos leucócitos córados pelo metodo de LOEFFLER observam-se incluzões em fórma de granulos no interior de vacuolos, redondos ou ovais, nitidamente limitados e que se assemelham aos corpusculos descritos.

O denominado ultra-filtrado obtido pela passajem atravéz de camadas coloidais não continha mais virus ativo; coelhos inoculados por via subcutanea com esse produto, por 3 vezes no intervalo de 4 dias, com 2 cc. de cada vez não aprezentaram sintoma morbido algum, e não se mostraram imunes quando inoculados com o material virulento, como acontece, na *Hühnerpest,* com as galinhas inoculadas com o ultrafiltrado.

Wird Variolapustelmaterial zu Ausstrichen verarbeitet, die nach der nassen Methode mit Sublimatalkohol fixiert und hernach mit Hämatoxylin gefärbt werden, so findet man neben vielen polynucleären Leucocyten ab und zu ovale oder runde intensiv gefärbte Körper, die nichts anderes sind als degenerierte Kernreste der polynucleären Leucocyten. Zwischen diesen Körpern und den Kernen der zu Grunde gehenden Leucocyten finden sich alle Uebergänge.

Für die Beurteilung der GUARNIERI'*schen Körper* als Reaktionsprodukte der Zelle und zwar hauptsächlich der Plastinkomponente des Kernes ist die Tatsache von Interesse, dass diese nicht in allen Fällen neben dem Kern als selbständige Gebilde auftreten, sondern vielfach nur die Nucleolen vergrössert sind. In einem Falle, da Variolavirus mit 21 Tage altem Variolaserum verimpft wurde, blieb die Bildung der intraplasmatischen GUARNIERI'*schen Körperchen* aus, dagegen waren die Nucleolen der Kerne derart vergrössert, dass sie als GUARNIERI'*sche Körperchen* imponierten. Auch in der Nickhaut des *Gecko* konnte seinerzeit nach Vaccineimpfung eine Vergrösserung der Nucleolen nachgewiesen werden.

Bezüglich der Biologie des Vaccine-Erregers sei hier noch auf folgende Tatsachen hingewiesen: Durch etwa 20-stündige Einwirkung von Saponin, Galle, taurocholsaurem und ölsaurem Natrium wird das Virus abgetötet, durch Lecithin, Marke *Agfa,* durch $^3/_4$ Stunden zentrifugiert und etwa 4 Stunden sedimentiert, erhält man auf der Kaninchenkornea nur eine ganz lokale Reaktion. In den nach LÖFFLER gefärbten Leucocyten wurden kleine, ganz scharf umschriebene, runde oder ovale Lücken mit einem körnigen Einschluss, der den beschriebenen Körperchen ähnlich war, beobachtet.

Die sogenannten Ultrafiltrate, die durch eine Filtration durch Kolloidschichten gewonnen wurden, enthielten kein aktives Virus mehr; Kaninchen, die subkutan mit ihnen in Intervallen von 4 Tagen 3 mal mit je 2 ccm. behandelt wurden, zeigten keine Krankheitserscheinungen, erwiesen sich auch bei nachfolgenden Impfungen als nicht immun, ebenso

II. Circulação do virus variolico no corpo

Repetidas vezes foram feitas inoculações sobre a pele raspada do abdome e na cornea de coelhos com abundante material de sangue, sôro, extratos de baço, rins e figado de individuos que sucumbiram á variola confluente ou hemorrajica. Para obter tais extratos reduziam-se os orgãos a pesquizar a fragmentos e depois cuidadozamente se os triturava em um gral. Em alguns cazos, obtivémos apenas reações pozitivas macroscopicas. Num cazo de inoculação com sangue de variola *hemorrajica,* feita, não só nas 2 corneas de 4 coelhos, como na pele raspada do abdome obtivémos apenas numa cornea uma reação *retardada,* no fim de 6 dias e os córtes revelaram nella a prezença dos *corpusculos* de GUARNIERI. O virus, ás vezes, atravessa a placenta, e, inoculações com rezultados pozitivos foram obtidas em corneas de coelhos com o extrato de figado de feto de uma mulher falecida de variola confluente. Nas corneas assim inoculadas, puderam ser caraterizados, poucos *corpusculos* de GUARNIERI, 3 dias apoz a inoculação. E' digna de nota a circumstancia de que o feto não aprezentava sinal algum exterior da molestia.

Dessas pesquizas resalta que ha *generalização de virus variolico,* mas que, em geral, ella dura apenas um tempo determinado; e, mais tarde, apoz erupção das pustulas, apenas pela experimentação se póde verificar uma escassa circulação do virus. Segundo CALMETTE e GUERIN, mesmo apoz inoculação intravenoza o virus vacinico só circula no organismo pelo espaço de 24 hóras; durante esse tempo se póde obter uma formação artificial de pustulas vacinais, raspando ou arrancando os pêlos dos coelhos inoculados. Destas pesquizas decorrem ainda os fatos de que: 1.º o virus possue uma tendencia a encantoar-se nas celulas, aí se multiplicando, e 2.º, de que sua prezença *não é constante* nos liquidos do organismo. E' mais um *parazito da celula* que um *parazito dos liquidos organicos.* E' admiravel que com o suco obtido por expressão dos *orgãos internos,* apenas se tenham conseguido *poucos*

wie die Hühner, die mit Ultrafiltraten der Hühnerpest vorbehandelt worden sind.

II. Das Kreisen des Variolavirus im Körper

Wiederholt wurde Blut, Blutserum, ferner Extrakte von Milz, Niere und Leber von an konfluirender oder hämorrhagischer Variola gestorbenen Personen auf die rasierte Bauchhaut eines Kaninchens und auf mehrere Kaninchenkorneas in grosser Menge verimpft. Die Extrakte wurden in der Weise gewonnen, dass die fraglichen Organstücke zunächst fein zerschnitten und sodann in einer Reibschale sorgfältig zerrieben wurden. Nur in einigen Fällen erhielten wir *makroskopisch* positive Reaktionen. In einem Falle von Impfung mit Blut eines *hämorrhagischen* Falles an zwei Kaninchenkorneas sowie auf die rasierte Bauchhaut eines Kaninchens trat nur auf einer Kornea erst am 6. Tage sehr *verspätet* eine Reaktion auf und es konnten sodann in Schnittpräparaten die GUARNIERI*schen Körperchen* nachgewiesen werden. Das Virus passiert unter Umständen auch die Placenta und es wurden mit Leberextrakt eines Fötus, dessen Mutter an *Variola confluens* gestorben, positive Impfungen vorgenommen und nach 3 Tagen in der geimpften Kaninchenkornea wenige GUARNIERI*sche Körperchen* nachgewiesen. Bemerkenswert ist der Umstand, dass der Fötus keine äusseren Krankheitserscheinungen zur Schau trug.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass eine *Generalisation des Variolavirus* zwar stattfindet, dass diese aber allgemein nur eine bestimmte Zeit dauert und dass später nach dem Ausbruch der Pusteln nurmehr ein spärliches Kreisen des Virus experimentell nachweisbar ist. Nach CALMETTE und GUERIN kreist das Vaccinevirus selbst nach intravenöser Injektion nur 24 Stunden im Organismus; während dieser Zeit kann man auch durch Rasieren oder Kahlrupfen der Haut des Kaninchens künstlich eine vaccinale Pustelbildung hervorrufen. Weiter ergibt sich aus diesen Versuchen, dass das Virus eine Tendenz besitzt, sich in den Zellen anzusiedeln und sich hier zu vermehren und dass es *nicht konstant* im

rezultados pozitivos de inoculação, emquanto que com o *material de pustulas, sem outro preparo,* foram conseguidas, *em todos os cazos, inoculações pozitivas.* Decorrem desses fatos, que carecem de ulterior verificação, que, apoz a generalização do virus da protopustulas hipoteitca de PFEIFFER, todas as celulas, segundo as pesquizas de MEYER e KEYSSELITZ respondem ao estimulo do antijeno por uma *iperplazia peculiar da substancia nucleolar,* mas que o virus se estabelece *depois, de preferencia,* no *ectoderma* ou no *tecido subcutaneo colajeno* (NOBEL e HÜCKEL) e que d'aí tambem parte a imunidade. Em favor desta maneira de vêr fala tambem a pequena quantidade ou auzencia de anticorpos no sôro sanguineo e a *imunidade cutanea* admiravelmente duradoura.

III. Os fenomenos de imunidade na variola

Em nossas pesquizas procurámos verificar como se comportaria, inoculado na cornea de coelho o sôro de convalecentes de variola, colhido 12, 14, 15, 20, 24, 30 e 40 dias apoz cicatrização das pustulas, misturado com quantidades iguais de conteúdo de pustulas variolicas, colhido, tanto quanto possivel, em pustulas frescas, e deixados em contato na geleira durante 20 a 24 hóras, sendo repetidas vezes ajitado. Demonstraram as pesquizas de VOIGT que a *variola humana* inoculada na cornea de coelhos produz sintomas tipicos não muito violentos e que se póde verificar por meio de córtes a existencia de *corpusculos* de GUARNIERI. Considerámos a auzencia desses corpusculos, na cornea como um *indice da ação paraziticida de sôro utilizado.* Seja, porém, aqui recordado que tambem na *variola humana,* nas celulas da cornea dos coelhos não se encontram sempre os *corpusculos* de GUARNIERI junto ao nucleo, mas que muitas vezes só se verifica um aumento dos nucleolos no interior do nucleo. Fatos analogos foram verificados na *cornea do homem* infetado pela variola. Uma cauza perturbadora no julgamento microscopico d'uma inoculação corneana é que, muitas vezes, com a linfa são inoculados estreptococos que produzem alte-

allgemeinen Säftekreislauf auftritt. Es ist *mehr ein Zellparasit* als *ein Säfteparasit.* Auffallend ist, dass mit den Presssäften aus *den inneren Organen nur wenige positive Impfresultate* erzielt worden sind, während wir mit dem *Pustelmaterial,* ohne *es weiter aufzuschliessen, in allen Fällen positive Impfungen* vornehmen konnten. Aus diesen noch weiter nachzuprüfenden Tatsachen folgt, dass nach der Generalisation des Virus von der hypothetischen Protopustel PFEIFFER's zwar alle Zellen nach den Untersuchungen von MAYER und KEYSSELITZ mit besonderen *Hyperplasien der Nucleolarsubstanzen* auf die Antigene antworten, dass aber das Virus sich *später vorwiegend im Ectoderm* oder in dem *kollagenen Gewebe der Subcutis* (NOBEL und HUECKEL) ansiedelt und von hier aus auch die Immunisierung stattfindet. Für diese Auffassung spricht auch der *geringe oder fehlende Antikörpergehalt im Blutserum* und die auffallend *lang andauernde kutane Immunität.*

III. Immunitätserscheinungen bei der Variola

Bei unseren Untersuchungen prüften wir zunächst das Serum von Patienten im Rekonvaleszentenstadium, also 12, 14, 15, 20, 24, 30, 40 Tage nach dem Abheilen der Pusteln, brachten dieses mit gleichen Mengen Variolapustelinhalt, der aus möglichst jungen Pusteln gewonnen wurde, auf etwa 20—24 Stunden im Eisschrank zusammen und verimpften es nach wiederholtem Durchschütteln auf die Kaninchenkornea. Nach den Untersuchungen von VOIGT ruft *Variola humana* auf der Kaninchenkornea typische, nicht zu stürmische Erscheinungen hervor und in den Schnitten kann man GUARNIERI'*sche Körperchen* nachweisen. Das Fehlen dieser Körperchen in den Schnitten sahen wir als ein *Zeichen für die parasiticide Wirkung des verwendeten Serums an.* Allerdings muss gleich hier betont werden, dass bei der *Variola humana* in den Zellen der Kaninchenkornea nicht überall neben den Kernen GUARNIERI'*sche Körperchen* liegen, sondern man findet oft blos im Kern vergrösserte Nucleolen. Analoge Verhältnisse konnten auch in den *menschlichen Korneas* bei den

rações progressivas do epitelio corneano. Macroscopicamente, a cornea reaje, em todos os cazos, da maneira uzual, já por varias vezes descrita. Microscopicamente foram *sempre* verificados os *corpusculos* de GUARNIERI, embóra em quantidade variavel. O sôro de 12 a 14 dias, de acordo com essas pesquizas não mata *definitivamente* o virus variolico. Sob a influencia do sôro de 12 dias, o numero de *corpusculos* de GUARNIERI *não era muito consideravel.* O sôro de 14 dias permitia a formação de maior cópia de corpusculos e sob a ação do sôro de 49 dias apareciam, não só aumento de volume dos nucleolos, como, se verificava junto dos nucleos a prezença dos *corpusculos* de GUARNIERI. O sôro variolico apoz um certo tempo, quando muito, enfraquece o virus e mostra, em geral, uma *auzencia de anticorpos.* Do mesmo modo, o virus variolico, não se deixa influenciar pela ação d'um sôro vacinico proveniente d'um homem alerjetico inoculado repetidas vezes, no espaço de 3 anos, assim como tambem, a vacina não é influenciada pelo sôro de variolozo de 12 dias de molestia, colhido apóz dezaparecimento dos sintomas morbidos, da maneira já referida.

Na *epidemia* que tivemos a oportunidade de observar achava-se o *virus variolico sempre associado a um estreptococo,* ajustando-se aqui entre elles, uma relação de simbioze ocazional analoga á das complicações da escarlatina, contribuindo para a gravidade de seu decurso. Inoculações feitas com esses 2 microorganismos, em series de pesquizas perfeitamente determinadas forneceram, em todos os cazos observados, rezultados muito particulares. Tratando-se corneas de coelhos com uma mistura de:

1.º Virus variolico (tanto quanto possivel material colhido em pustulas frescas)
2.º Sôro ativo (é indiferente que se tome sôro normal de homem, cavalo ou sôro vacinico ou variolico do 12.º ao 40º dia) e
3.º Estreptococos (vivos ou mortos por um aquecimento de meia hóra a 60º)

verifica-se, em comparação com as testemunhas correspondentes, que já no fim de 24

Infektionen mit Variola nachgewiesen werden. Ein anderer Uebelstand bei der mikroskopischen Beurteilung der Korneaimpfungen ist der, dass vielfach mit der Lymphe Streptokokken mit verimpft werden und derart oft weitgehende Defekte des Korneaepithels veranlassen. Makroskopisch reagierte in allen Fällen die Kornea in der üblichen, mehrfach beschriebenen Weise. Mikroskopisch wurden *immer* GUARNIERI'*sche Körperchen,* allerdings in *schwankenden* Mengenverhältnissen nachgewiesen. Das Serum von 12 bis 14 Tagen tötete auf Grund dieser Versuche das Variolavirus *nicht endgültig* ab. Die Menge der GUARNIERI'*schen Körperchen* war unter Einfluss des 12-Tageserums *nicht sehr erheblich.* Das Serum von 14 Tagen lieferte eine reichlichere Ausbeute und unter Einwirkung des 40-Tageserums waren sowohl die Nucleolen vergrössert als auch traten neben den Kernen GUARNIERI'*sche Körperchen* auf. Das Variolaserum schwächt demnach nach einem gewissen Zeitpunkt höchstens das Virus ab und zeichnet sich im allgemeinen durch einen *Mangel an Antikörpern* aus. Das Variolavirus wird in gleicher Weise nicht durch das Vaccineserum eines durch 3 Jahre wiederholt geimpften, allergetischen Menschen beeinflusst, ebensowenig beeinträchtigt das Variolaserum vom 12. Tage nach dem Aufhören der Erscheinungen die Vaccine in nennenswerter Weise.

Bei der Epidemie, die wir zu beobachten Gelegenheit hatten, war das *Variolavirus stets mit einem Streptokokkus vergesellschaftet* und bedingte so in diesem *gelegentlichen Symbioseverhältnisse ähnlich wie beim Scharlach* Komplikationen in der Schwere des Krankheitsverlaufes. Impfungen, die mit diesen *beiden* Mikroorganismen unter ganz bestimmten Versuchsanordnungen vorgenommen worden sind, lieferten in allen beobachteten Fällen ein ganz eigenartiges Resultat. Behandelt man nämlich eine Kaninchenkornea mit einer Mischung:

1. von Variolavirus (möglichst frisches Pustelmaterial),
2. aktivem Serum (es ist gleichgültig, ob man normales Menschenserum, Pferdeserum, Vaccineserum oder Variolaserum von 12 bis 14 Tagen nimmt) und

hóras ha *reações extremamente intensas* associadas com perdas progressivas do epitelio, leucocitoze e profundas crozões. As perdas epiteliais eram muitas vezes muito consideraveis e, por uma especie de citolisteze, as celulas pigmentadas do limbo corneano caminhavam centripetamente. Encontravam-se os estreptococos entre as celulas epitaliais; mais tarde, tambem, sob a fórma de acumulos entre as fibras do tecido conjuntivo sotoposto á membrana bazal. Como testemunhas foram feitas inoculações com as seguintes misturas, preparadas 24 hóras antes:

1.º Estreptococos vivos + sôros de diversas proveniencias.
2.º Virus variolico + sôros inativos de proveniencias diversas.
3.º Sôro só.
4.º Estreptococos só.
5.º Virus variolico normal, só.
6.º Virus variolico inativado, a 45º.
7.º Estreptococos + virus variolico.

Pensámos em tornar as experiencias mais exatas, empregando nas misturas acima e deixando em contato durante 24 hóras o virus variolico, préviamente passado atravéz velas de BERKEFELD. Infelizmente, estes ensaios não deram rezultados claros, porque, pelo fato da filtração, se reduzia muito a quantidade de virus. Todavia, dessas pesquizas resalta que, para que se estabeleça uma intensa reação devem coexistir 3 elementos: *virus variolico, toxina estreptococica* e a *parte termolabil* de um sôro qualquer. Estes fatos seguramente *nada* têm que vêr com a imunidade porque, em todos os cazos, nas poucas celulas epiteliais ainda conservadas se viam *corpusculos* de GUARNIERI, assim como tambem a especie de sôro uzada não tinha influencia sobre o rezultado. A *associação ocazional do virus variolico e estreptococo* pertence, segundo FRANK (Contribuição para a biolojia das plantas 1877) ao grupo dos fenomenos biolojicos, descritos sob o nome de *Simbioze,* e aqui se trate de *pseudo-parazitismo,* porque os 2 organismos são, no que toca a alimento, independentes um do outro. Elles podem tambem subzistir independentemente,

3. Streptokokken (lebend oder bei 60° C. auf eine halbe Stunde abgetötet),

so erhält man im Verhältnis zu den entsprechenden Kontrollen bereits nach 24 Stunden *äusserst stürmische Reaktionen,* verbunden mit weitgehendem Epithelverlust, Leucocytose und tiefen Erosionen. Die Epithelverluste waren oft sehr bedeutend und durch eine Art von Cytolisthesis rückten die pigmentierten Zellen des Kornearandes zentripetal vor. Die Streptokokken fand man zwischen den Epithelzellen, später aber auch nesterweise zwischen den unter der Basalmembran verlaufenden Bindegewebszügen. Zur Kontrolle wurden Impfungen mit folgenden 24 Stunden alten Mischungen vorgenommen:

1. lebende Streptokokken + verschiedenartiges Serum,
2. Variolavirus + verschiedene inaktive Sera,
3. Serum allein,
4. Streptokokken allein,
5. normales Variolavirus allein,
6. bei 45° inaktiviertes Variolavirus,
7. Streptokokken + Variola.

Die Versuche hofften wir noch in der Weise exakter zu gestalten, dass wir das Variolavirus vorher durch *Berkefeld-Filter* filtrierten und dann 24 Stunden die oben erwähnten Mischungen ansetzten. Leider fielen gerade diese Versuche nicht deutlich aus, da das Virus durch die Filtration viel *an Menge* eingebüsst hatte. Immerhin geht aus den Versuchen hervor, dass an dem Zustandekommen der stürmischen Reaktionen *3 Elemente beteiligt sind: Variolavirus, Streptokokkentoxine* und ein *thermolabiler Bestandteil* irgend eines Serums. Mit der Immunität haben die Phänomene sicherlich *nichts* zu tun, weil in allen Fällen in den wenigen noch erhaltenen Epithelzellen GUARNIERI*'sche Körperchen* nachgewiesen worden sind und auch die Art des Serums nicht ausschlaggebend war. Die *gelegentliche Vergesellschaftung von Variolavirus und Streptokokken* gehört nach FRANK (Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1877) in die Gruppe der biologischen Erscheinungen, die wir als *Symbiose* bezeichnen, und zwar handelt es sich hier um *Pseudoparasitismus,* da beide Organismen in ihrer Ernährung von *einander*

mas, se ocazionalmente vierem juntos, obram perturbando duplamente o organismo atacado. WARD (Philos. Trans. 1892) descreveu essa «associação dijuntiva» de dois organismos, que ocazionalmente exercem, um sobre o outro e de maneira tranzitoria relações de trocas, sob o nome de *Meta* ou *Antibioze (antagonismo* DE BARY). PFEFFER encararia o cazo de simbioze aqui descrito como uma simbioze dijuntiva. Relativamente á infeção do organismo devemos agrupar os fenomenos de simbioze em 3 seções:

1.º Simbiotas que absolutamente se não influenciam mutuamente nos seus modos de viver (simbiotas indiferentes).
2.º Simbiotas que ganham certa elevação de virulencia e assim prejudicam em maior escala o organismo atacado (simbiotas sinerjeticos).
3.º Simbiotas, dos quais um prepara o alimento para o outro.

Assim o *Aspergillus orizæ* ou o *Mucor orizæ* prepara o alimento para o fermento, sacarificando-lhe o amido (simbiotas antibioticos).

Ao segundo grupo pertence a simbioze aqui descrita entre o estreptococo e o virus variolico. Igual fato se verifica entre o estreptococo e o ajente produtor da escarlatina. Do mesmo modo obram sinerjicamente, segundo LECLAINCHE e VALLÉE (Ann. Institut Pasteur 1900) uma estreptotricea cromojena ou um estreptococo não patojeno, com o bacilo do carbunculo sintomatico. Ao contrario, é inativa a associação do *Bac. rhusiopathiæ sui* ou o *Bacterium coli* com o mesmo virus do carbunculo sintomatico.

A explicação mais simples e natural para a ação simbiotica de conjunto dos 2 microorganismos parece ser que, em 1.º lugar as celulas epiteliais são lezadas pelo virus variolico e reajem pela hipertrofia dum dos componentes celulares, que se relacionam microscopicamente com a substancia nuclear (*corpusculos* de GUARNIERI); em virtude desta desproporção o processo vital sofre um enfraquecimento e não póde opôr rezistencia alguma á toxina do estreptococo.

durchaus unabhängig sind. Sie können auch selbständig auftreten, gelegentlich aber zusammengebracht, wirken sie auf den befallenen Organismus doppelt zerstörend. WARD (Philos. Trans., 1892) bezeichnete diese «disjunktive Association» zweier Organismen, die in gelegentlichen, vorübergehenden Wechselbeziehungen zu einander stehen, als *Meta- oder Antibiose* (*Antagonismus* DE BARY'S). PFEFFER würde den hier beschriebenen Symbiosefall unter dem Begriff der disjunkten Symbiose zusammenfassen. In Bezug auf die Infektion des Organismus müssen wir die Erscheinungen der Symbiose in 3 Gruppen einteilen:

1. Symbionten, die durch ihre Lebensweise einander garnicht beinflussen (indifferente Symbionten),
2. Symbionten, die eine Art von Virulenzsteigerung erfahren und den befallenen Organismus in erhöhtem Masse schädigen (synergetische Symbionten),
3. Symbionten, von denen der eine dem anderen den Nährboden vorbereitet.

So bereitet der *Aspergillus oryzae* oder *Mucor oryzae* der Hefe den Nährboden vor, indem er vorher die Stärke verzuckert. (Antibiotische Symbionten).

In die zweite Gruppe gehört die hier beschriebene Symbiose zwischen Streptokokken und Variolavirus. Aehnliche Verhältnisse sind auch von dem Scharlacherreger und den Streptokokken bekannt. In gleicher Weise wirkt synergetisch nach LECLAINCHE und VALLÉ. (Ann. Inst. Pasteur, 1900) eine chromogene Streptothrix oder ein nicht pathogener Streptokokkus in Verbindung mit dem Rauschbrandvirus. Unwirksam ist dagegen die Assoziation des Rauschbrand mit dem *Bacillus rhusiopathiæ sui* oder *Bakterium coli.*

Die einfachste und natürlichste Erklärung für das symbiotische Zusammenwirken beider Mikroorganismen scheint die zu sein, dass zunächst die Epithelzellen durch das Variolavirus geschädigt werden und durch eine Hypertrophie einer Zellkomponente, die mikroskopisch an die Nuklearsubstanzen (GUARNIERI'*sche Körperchen*) gebunden ist, reagieren; durch diese Missverhältnisse erleiden sie im

As toxinas parecem prejudicar diretamente o protoplasma das celulas, pelo que morre este com rapidez. Secundariamente os cócos se multiplicam com vivacidade e afetam de modos varios as demais circumscrições organicas. As celulas anormais do corpo, em relação com as normais sofrem mais prejuizo com o ataque dos estreptococos, com o que está de acôrdo a observação de JANICKE e NEISSER «(Zentralbl. f. Chirurgie» 1884), que, em consequencia duma inoculação de erizipela em doente de carcinoma verificaram que os estreptococos produziram um processo regressivo das celulas carcinomatozas. De que neste cazo se trata, na realidade, da toxina estreptococica é verificavel, porquanto mesmo rezultado se obtem, empregando culturas de estreptococos mortos pelo calor. Segundo LINGELSHEIM os venenos do estreptococo são bastante rezistentes ao calor. Papel analogo ao reprezentado na variola exercem os estreptococos em varias afeções vacinicas, no impetigo (BALZER, GRIFFON, MESLAY e KURTH) no exantema escarlatinozo e reumatismo articular. Tambem se atribue o exantema da escarlatina traumatica a ação toxica do estreptococo. Tambem, de acôrdo com a definição de simbioze acima dada, póde haver variola sem estreptococos, assim como RUMPEL observou cazos de escarlatina, nos quais o estreptococo não era caraterizavel.

Lebensgetriebe eine Schwächung und können den Toxinen der Streptokokken keinen Widerstand mehr leisten. Die Toxine scheinen direkt das Protoplasma der Zelle zu schädigen, worauf diese rapide zugrunde geht. Sekundär vermehren sich die Kokken sehr lebhaft und affizieren in mannigfaltiger Weise die übrigen Organbezirke. Dass abnorme Körperzellen im Verhältnis zu normalen Zellen von Streptokokkentoxinen mehr angegriffen werden, dafür spricht die Beobachtung von JANICKE und NEISSER (Zentralbl. für Chirurgie, 1884), der zufolge bei einem Impferysipel eines Karzinomkranken die Streptokokken die Krebszellen zu regressiven Prozessen veranlassen. Dass es sich hier um Toxine der Streptokokken handelte, dafür spricht auch der Umstand, dass wir mit durch Wärme abgetöteten Streptokokken dieselben Erscheinungen hervorrufen konnten. Nach LINGELSHEIM sind die Streptokokkengifte gegen Wärme ziemlich resistent.

Eine ähnliche Rolle wie bei der Variola spielen die Streptokokken bei manchen Vaccineaffektionen, bei Impetigo (BALZER und GKIFFON, MESLAY, KUKTH), bei Scharlachexanthemen und Gelenkrheumatismus. Ferner führt man die Exantheme bei Wundscharlach gleichfalls auf eine Giftwirkung der Streptokokken zurück. Ebenso wie es der oben gelieferten Definition der Symbiose zufolge eine Variola ohne Streptokokken gibt, sind von RUMPEL Scharlachfälle beobachtet worden, bei denen Streptokokken nicht nachweisbar waren.

ESTAMPA 7

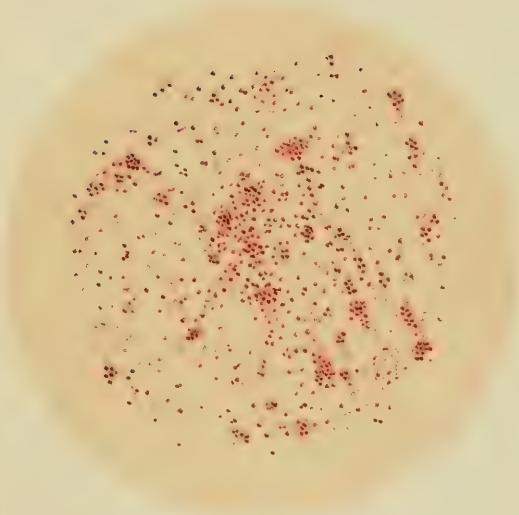
Fig. 1. Microbio da variola.
Ocular 8. Imersão homojena 2 mm.
Abertura 1.30. Zeiss.

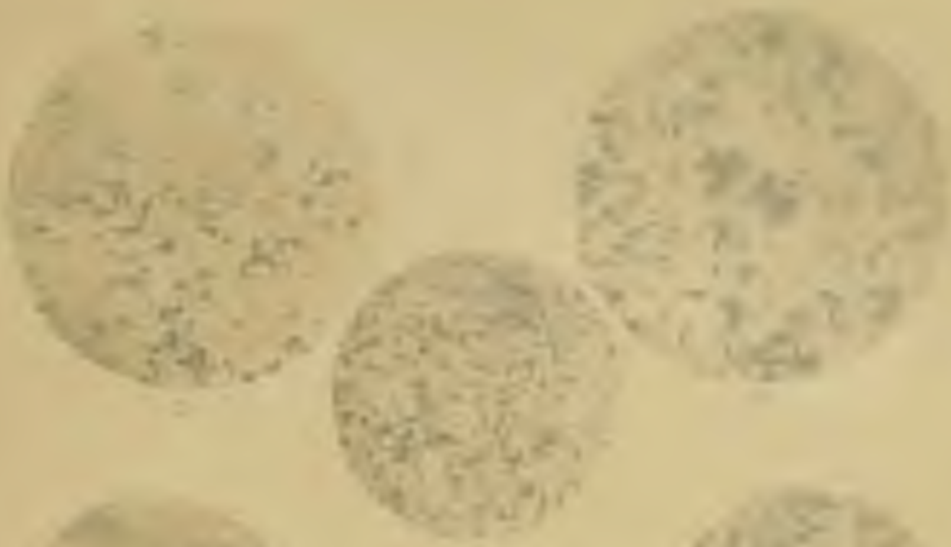
TAFEL 7

Fig. 1. Variolaerreger.
Ocular 8. Homogene Immersion 2 mm.
Apert. 1.30. Zeiss.

TAFEL 7

Fig. 1. Variolaerreger.
Okular 8. Homogene Immersion 2 mm.
Apochr. 1.30. Zeiss.





ESTAMPA 8

Fig. 2-4. Fotomicrografias do microbio da variola e estreptococcos. Ocular 8. Imersão homojena 2 mm. Abertura 1.30.
Fig. 5. Microbio da variola. Ocular 8. Imersão homojena 2 mm.
Fig. 6. It. com estreptococcos.
Fig. 7-9. Microbio do epitelioma das aves (maior que o microbio da variola).

TAFEL 8

Fig. 2-4. Mikrophotogramme von Variolaerregern und Streptokokken. Ocular 8. Homog. Immers. 2 mm. Apert. 1.30.
Fig. 5. Variolaerreger. Ocular 8. Homog. Immers. 2 mm.
Fig. 6. Dasselbe mit Streptokokken.
Fig. 7-9. Erreger des Epithelioms der Vögel (grösser als Variolaerreger).

ESTAMPA 8

Fig. 2-4. Fotomicrografias do microbio da varíola e estreptococcos. Ocular 8. Imersão homogenea 2 mm. Abertura 1.30.

Fig. 5. *Mi*crobio da varíola. Ocular 8. Imersão homogenea 2 mm.

Fig. 6. Id. com estreptococcos.

Fig. 7-9. *Mi*crobio do epitelioma das aves (maior que o microbio da varíola).

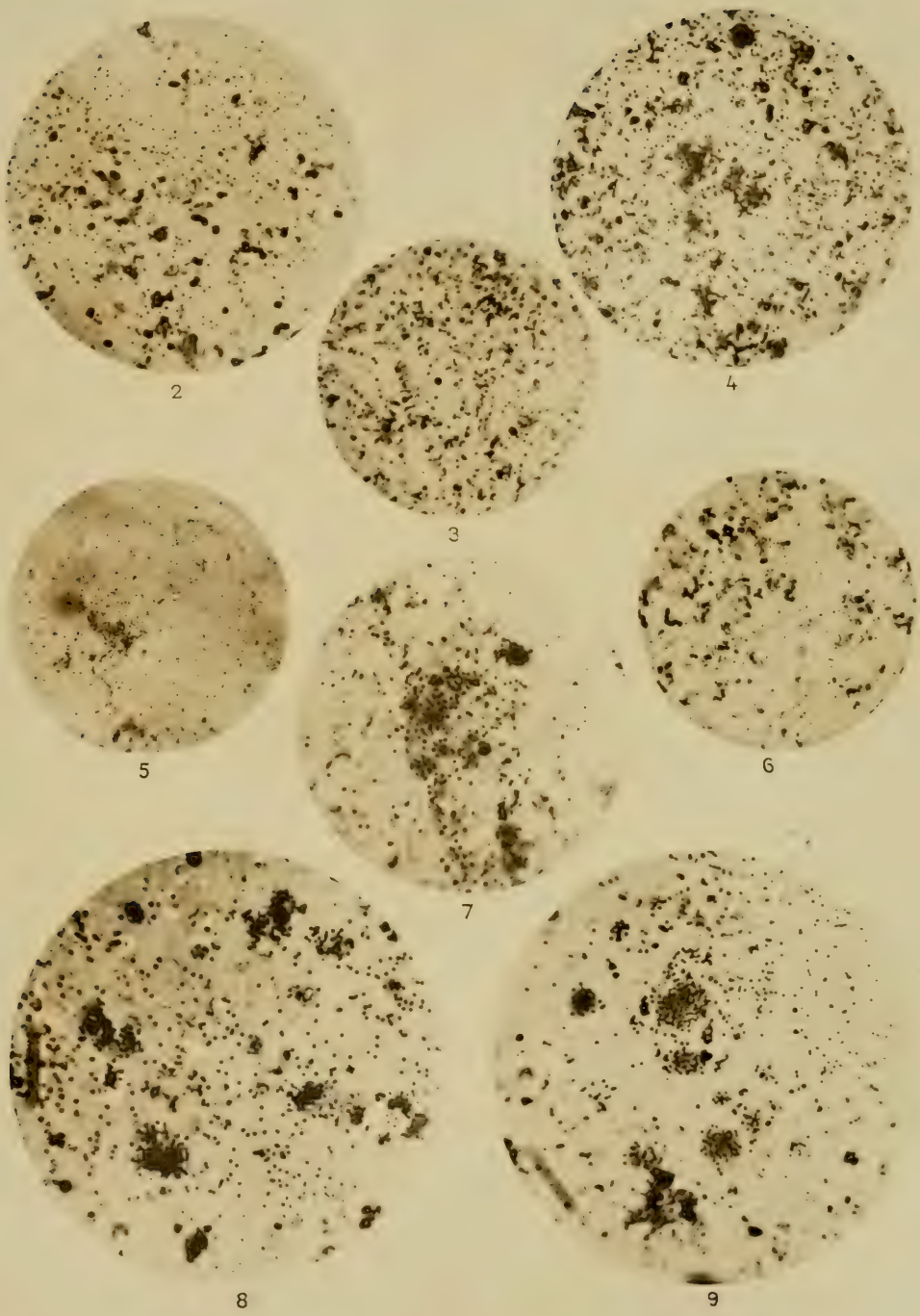
TAFEL 8

Fig. 2-4. *Mi*krophotogramme von Variola- erregern und Streptokokken. Ocular 8. Homog. Immers. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 5. Variolaerreger. Ocular 8. Homog. Immers. 2 mm.

Fig. 6. Dasselbe mit Streptokokken.

Fig. 7-9. Erreger des Epithelioms der Vögel (grösser als Variolaerreger).


2
3
4
5
6
7
8
9

Nova tripanozomiaze humana.

Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem

pelo

Dr. Carlos Chagas,

Assistente.

(Estampas 9 a 13 e 10 figuras no texto)

Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen.

Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, Erreger einer neuen Krankheit des Menschen

von

Dr. Carlos Chagas,

Assistenten.

(Mit Tafeln 9—13 und 10 Textfiguren)

Introdução.

Em 1907 fomos incumbido pelo diretor Dr. OSWALDO GONÇALVES CRUZ, de executar a campanha anti-paludica nos serviços de construção da Estrada de Ferro Central do Brazil, na rejião norte do Estado de Minas Geraes. Tivemos informações da existencia ali do hematofago, denominado *barbeiro* pelos naturais da zona, que habita os domicilios humanos, atacando o homem á noite, depois de apagadas as luzes, ocultando-se, durante o dia, nas frestas das paredes, nas coberturas das cazas, em todos os esconderijos, emfim, onde possa encontrar guarida. De regra, é o hematofago visto em maior abundancia nas habitações pobres, nas choupanas de paredes não rebocadas e cobertas de capim. Ali a reprodução delle é consideravel; são encontrados em numero imenso nas frestas das paredes e constituem condição anti-vital das mais notaveis, pela dificuldade trazida ao repouzo do homem. Muita vez verificámos o ataque do homem pelo hematofago: Poucos minutos apoz a extinção da luz nos apo-

Einleitung.

Im Jahre 1907 wurde ich von Dr. OSWALDO GONÇALVES CRUZ, Leiter des Institutes von *Manguinhos* beauftragt, die Bekämpfung der Malaria bei der Konstruktion der brasilianischen Zentralbahn im Norden des Staates *Minas Geraes* zu organisieren. Daselbst hörte ich von dem Vorkommen eines gefürchteten blutsaugenden Insektes, das bei den Einwohnern als *Barbier (Barbeiro)* bekannt ist. Dasselbe lebt in den menschlichen Wohnungen, woselbst es nachts, nach Löschen der Lichter, die Bewohner angreift, während es bei Tage sich in den Spalten der Wände, in den Zimmerdecken und wo es sonst eine sichere Zuflucht findet, versteckt hält. In der Regel wird dieser Blutsauger in grösster Menge in den Wohnungen armer Leute gefunden, welche nicht getüncht und nur mit Gras gedeckt sind. Hier vermehrt derselbe sich so sehr, dass er in ungeheurer Menge auftritt und durch die Störung des Schlafes eine höchst ungünstige Wirkung ausübt. Ich war oftmals Zeuge der Angriffe dieser Blutsauger, welche in den

zentos saem elles dos esconderijos, em grande numero, e vêm picar os individuos, de preferencia no rosto. Acendendo-se o lume os hematofagos fojem rapidamente, sendo mesmo dificil, deste modo, a captura delles.

O hematofago só permanece nas habitações emquanto aí rezide o homem; das cabanas abandonadas bem depressa elle dezaparece, certo pelo fato de auzencia de alimentação.

Entre os naturais é crença geral que o hematofago é inseto silvestre, vindo á noite, para o interior das cazas, onde se domicilia e se reproduz. Si assim é, não o sabemos, porquanto, nunca nos foi dado verificar aquelle fato e tambem porque nunca encontrámos o inseto fóra de habitações humanas.

E' o hematofago referido um hemiptero heteroptero, da familia *Reduviidae,* genero *Conorhinus.* A especie é, provavelmente, *megistus* BURM. (Est. 9). O estudo do inseto, especialmente a biolojia delle, vai sendo feito na seção de zoolojia do Instituto, pelo Dr. ARTHUR NEIVA, que do assunto, quando oportuno, dará conhecimento exato.

Examinando o conteúdo do intestino posterior de exemplares de conorrinos, colhidos em Minas Geraes, no interior de habitações humanas, verificámos ali a prezença de numerozos flajelados com os carateres morfolojicos de critidias. Enviámos, então, hematofagos para o Instituto e, aí, o nosso diretor, Dr. OSWALDO CRUZ, tentou infetar um macaco da especie *Callithrix penicillata,* fazendo-o picar por diversos exemplares do hemiptero. Decorridos 20 ou 30 dias, apoz a picada, foram encontrados no sangue periferico daquelle macaco tripanozômos em grande numero, de morfolojia inteiramente diversa da de qualquer das especies conhecidas do genero *Trypanosoma.*

Iniciámos, então, o estudo do flajelado, conseguindo, desde logo, infetar por inoculação diversos animais de laboratorio, cobaias, cães, coelhos e outros macacos.

O parazito mostra-se patojenico para todos esses animais, mais para os *Callithrix* e para as cobaias e muito menos para os cães que,

Wohnräumen wenige Minuten nach Auslöschen der Lichter in grosser Zahl aus ihren Schlupfwinkeln hervorkommen und die Bewohner mit Vorliebe im Gesicht stechen. Wenn man dann das Licht anzündet, so fliehen diese Schmarotzer mit grösster Geschwindigkeit, so dass es schwer hält, sie bei dieser Gelegenheit zu fangen.

In den Wohnungen verbleiben diese Tiere nur so lange, als der Mensch sie benützt; aus verlassenen Hütten verschwinden dieselben sehr bald, wohl sicher in Folge mangelnder Nahrung.

Unter den dortigen Einwohnern herrscht allgemein die Ansicht, dass das blutsaugende Insekt ursprünglich im Walde lebt und nachts, vom Lichte angezogen, ins Innere der Häuser dringt, wo es sich niederlässt und weiter vermehrt. Ich bezweifle, dass es sich so verhält, da ich dieses Faktum nie beobachten konnte und das Insekt niemals ausserhalb menschlicher Wohnungen antraf.

Der erwähnte blutsaugende Schmarotzer gehört zu den *Hemiptera heteroptera,* zur Familie *Reduviidæ* und in das Genus *Conorhinus* (Tafel 9). Die Species ist wahrscheinlich *megistus* BURM. Das Studium dieser Insekten und insbesondere ihrer Biologie wird in der zoologischen Abteilung des Institutes von Dr. ARTHUR NEIVA ausgeführt, der darüber zu gelegener Zeit eingehend berichten wird.

Bei der Untersuchung des Hinterdarmes von *Conorhinus*wanzen, welche im Staate *Minas Geraes* im Innern menschlicher Wohnungen gesammelt waren, konstatierte ich zahlreiche Flagellaten mit den morphologischen Charakteren der *Crithidien.* Ich sandte darauf solche Wanzen an das Institut, woselbst unser Direktor, Dr. OSWALDO CRUZ, einen kleinen Affen der Species *Callithrix penicillata* zu infizieren suchte, indem er denselben von verschiedenen Exemplaren dieser Wanzenart stechen liess. 20—30 Tage nach der Application wurden im peripherischen Blute dieses Affen zahlreiche Trypanosomiden gefunden, die sich morphologisch deutlich von den anderen Arten des Genus *Trypanosoma* unterschieden.

Ich begann hierauf das Studium dieser Flagellatenart, wobei es mir gleich anfangs

quando adultos, sobrevivem longamente á infecção. O *Callithrix* e as cobaias morrem em tempo variavel, geralmente com menos de 1 mez; a cobaia em pouco mais que o *Callithrix;* o mesmo acontece ao cão novo.

Dos animais experimentados, o mais sensivel parece ser o *Callithrix*. Neste a infeção é sempre mais abundante do que nos outros animais e a ação patojenica tambem mais acentuada. Durante todo o evoluir da molestia, no *Callithrix,* como nos outros animais de laboratorio, os parazitos são vistos no sangue periferico, havendo fazes nas quais aumenta de modo sensivel o numero de flajelados, o que parece indicar multiplicação periodica.

Já em nota anterior publicada nos «Arch. für Schiffs- und Tropenhygiene» fizemos referencia ao tripanozómida que estudamos, em sua evolução no conorrino e nos animais por elle infetados, tendo denominado, nesse comunicado, o parazito *Trypanosoma cruzi.* O modo de evolver todo particular deste protozoario, como se verá no correr deste trabalho, pareceu-nos poder justificar a creação, para elle, de novo genero, o que fizemos, passando por isto a denominal-o *Schizotrypanum cruzi.*

Depois de haver estudado o duplo ciclo evolutivo do flajelado nos animais de laboratorio e no inseto transmissor e ignorando qual fosse o hospedeiro habitual do parazito, quizemos realizar novas pesquizas na zona onde haviamos encontrado os *conorhini* infetados, no intuito de esclarecer, si possivel, aquella incognita. Foi de grande exito nesse ponto, o rezultado a que chegámos, visto termos verificado ser o flajelado parazito do homem, ajente etiolojico de entidade morbida bem caraterizada. Nem o fato foi, para nós, grande surpreza, porquanto, considerando os habitos do hematofago, que só habita os domicilios humanos, e nutre-se, de preferencia, de sangue do homem, era bem de admitir, de acordo ainda com a teoria filojenetica dos hemo-flajelados, pudesse o parazito em questão infetar a especie humana. E foi raciocinando deste modo que empreendemos exames de sangue

gelang, dieselbe durch Impfung auf verschiedene Laboratoriumstiere, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde und andere Affen zu übertragen. Der Parasit erwies sich für alle diese Tiere als pathogen, am meisten für Callithrixaffen und Meerschweinchen und viel weniger für den Hund, der, wenn erwachsen, die Infektion lange überlebt. Erstere Tiere sterben nach verschiedenen Zeiträumen, Meerschweinchen gewöhnlich vor Ablauf eines Monats und die Pinseläffchen wenig später; dasselbe beobachtet man bei jungen Hunden.

Von den Versuchstieren scheint die *Callithrix* am meisten empfindlich. Bei dieser ist die Infektion immer reichlicher und die pathogene Wirkung mehr ausgesprochen, als bei anderen Tieren. Während des ganzen Verlaufes der Krankheit aller dieser Versuchstiere erscheinen die Parasiten im peripheren Blute, indem die Zahl der Flagellaten zeitweise deutlich zunimmt, was eine periodische Vermehrung anzudeuten scheint. Ueber die Entwicklung der Trypanosomide in der Wanze und den damit infizierten Tieren habe ich im «Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene» schon vorläufig berichtet und sie «*Trypanosoma cruzi*» genannt. Die eigentümliche Entwicklung, über die ich in der vorliegenden Arbeit ausführlicher berichten werde, lässt es jedoch gerechtfertigt erscheinen, eine neue Gattung dafür aufzustellen, weshalb ich sie jetzt «*Schizotrypanum cruzi*» nenne.

Nachdem ich den doppelten Entwicklungsgang dieses Flagellaten im Versuchstiere und im übertragenden Insekte studiert hatte, ohne den gewöhnlichen Wirt zu kennen, wollte ich auch in der Zone, in welcher ich die infizierten *Conorhinus* angetroffen hatte, Untersuchungen anstellen, um, womöglich, auch dieses Problem aufzuklären. Das erhaltene Resultat erwies sich als von grosser Tragweite, da ich feststellen konnte, dass dieser Flagellat ein menschlicher Parasit und die Ursache eines eigenartigen und gut characterisierten Krankheitszustandes ist. Uebrigens war diese Tatsache für mich nicht sehr überraschend; in Anbetracht der Gewohnheiten des Parasiten, welcher nur in Wohnungen lebt und sich mit Vorliebe von menschlichem Blute ernährt,

sistematicos nos individuos domiciliados nas cazas onde encontrámos *barbeiros;* procedemos ainda nelles a pesquizas semeioticas demoradas, afim de verificar a existencia de elementos morbidos caracteristicos de tripanozomiazes. Examinámos, tambem, o sangue de animais domesticos que pernoitavam nas habitações humanas. Desde logo verificámos a existencia de tripanozómida no sangue periferico do gato.

Infeção do homem.

A historia clinica da nova especie morbida humana é ainda muito deficente, porquanto não nos foi dado acompanhar longamente doentes, estudando nelles, com a sequencia dezejavel, a sintomatolojia completa. Pouco sabemos do prognostico e das relações necessarias entre o evolver da especie morbida e o ciclo do ajente etiolojico, fatos de grande monta que vão depressa ocupar nossas pesquizas e dos quais procuraremos dar, oportunamente, minuciozo conhecimento.

No homem o que primeiro impressionou nossa atenção foi a existencia de conjunto de sintomas frequentes e uniformes, mais salientes nas creanças, sintomas que, desde logo se impunham a nosso raciocinio clinico como expressivos de entidade morbida autonoma. Eram delles os mais apreciaveis os seguintes:

Anemia profunda, com grande decadencia organica e, em muitas creanças, sensivel retardamento da evolução, e, nos adultos, infantilismo bem caraterizado; edemas, generalizados em alguns doentes, em outros, limitados a certas zonas; enfartamento ganglionar em todas as pleiades perifericas, podendo ser apreciados volumozos ganglios cervicais, axilares, crurais e inguinais; esplenomegalia, ás vezes consideravel, muito constante, sem que podesse ser atribuivel á infeção pelo impaludismo; hepatomegalia menos frequente; perturbações funcionais diversas, especialmente para o sistema nervozo, sendo de impressionar a condição inteletual precaria de muitas creanças, havendo, mesmo, muitos cazos de verdadeira imbecilidade.

konnte man — auch im Einklange mit der Theorie der phylogenetischen Entwicklung der Hämoflagellaten — annehmen, dass der fragliche Parasit den Menschen infizieren könnte. Von diesen Gedanken geleitet, unternahm ich eine systematische Blutuntersuchung bei den Bewohnern der Häuser, in welchen die «Barbeiros» gefunden wurden; zugleich nahm ich semeiotische Untersuchungen vor, um das Vorhandensein krankhafter Erscheinungen festzustellen, welche zur Kennzeichnung einer Trypanosomiasis dienen könnten. Ich untersuchte auch das Blut derjenigen Haustiere, welche in den menschlichen Wohnungen übernachteten, wobei ich gleich anfangs das Vorkommen des Trypanosoma im peripherischen Blute einer Katze konstatierte.

Die Infektion beim Menschen.

Die klinische Geschichte der neuen menschlichen Krankheitsart ist noch ungenügend, da ich nicht Gelegenheit hatte, einen Patienten längere Zeit zu beobachten und die ganze Symptomatologie mit wünschenswerter Genauigkeit zu verfolgen. Ueber die Prognose und die notwendigen Beziehungen zwischen dem Verlaufe des Krankheitsprozesses und dem Entwicklungszyklus des Erregers ist noch wenig bekannt; diese wichtigen Verhältnisse werden demnächst meine Aufmerksamkeit beschäftigen und ich hoffe, später darüber ausführlicher zu berichten.

Was beim Menschen zuerst meine Aufmerksamkeit erregte, war das Bestehen eines Komplexes von häufigen und übereinstimmenden Symptomen, welche bei Kindern auffallender waren; sie erschienen bei der klinischen Beobachtung sofort als Ausdruck einer selbständigen Krankheitseinheit. Am deutlichsten waren die folgenden zu erkennen: Hochgradige Anämie mit starkem organischen Verfall und eine im Verhältnis zum Alter auffällige Verspätung der Entwicklung mit ausgesprochenem Infantilismus; Oedeme, die bei einigen Patienten generalisiert, bei anderen auf gewisse Zonen beschränkt waren; Lymphdrüsenschwellungen, die an allen peripheren Gruppen zum Ausdruck kam, so dass ich grosse Nacken-, Achsel-, Schenkel- und Leistendrüsen beobach-

De informações cuidadozamente colhidas deduzimos ser muito grande a letalidade de creanças na zona. Referem os naturais como muito frequentes as convulsões infantis, em diversas idades, atribuindo áquelle síndrome a maioria de mortes das creanças. Ou assim é, morrem as creanças com predomio de sintomas para o lado do sistema nervozo, ou aprezentam, nos ultimos estádios de molestia fatal, verdadeira hidropizia, comparavel á da anquilostomiaze. E esse ultimo fato dá razão ás duas denominações pelas quais a molestia é conhecida pelos naturais, a de *opilação* e a de *canguary,* nomes dados pelo povo, em outras zonas onde grassa, á anquilostomiaze. Julgámos dever excluir a intervenção desta molestia do quadro morbido observado e para isso, apezar da auzencia de sinais clinicos daquella verminoze, procedémos a muitos exames de fezes, com rezultado negativo, naquelles doentes cujo aspeto morbido referimos.

Foi do modo seguinte que verificámos a infeção do homem pelo flajelado:

Em diversas habitações humanas, onde existiam *barbeiros,* em cujo intestino encontrámos abundantes fórmas de critidias, fizemos uma primeira vez exames de sangue, mais demorados nos doentes com a sintomatolojia referida. Nesta primeira pesquiza, cumpre observar, limitámo-nos a examinar, de cada doente, uma gota de sangue entre lamina e laminula, o que, de alguma fórma, justifica o rezultado negativo a que chegámos. Quatro dias depois, porém, chamado para medicar uma creança em estado grave, creança cujo sangue haviamos tambem examinado, verificámos, em pesquiza no estado vivo, a prezença de flajelados no sangue periferico. Córando preparados de sangue pelo metodo de GIEMSA concluimos ser o flajelado observado tripanozómida, de morfolojia inteiramente identica á do *Schizotrypanum cruzi,* cuja biolojia estudavamos no laboratorio, em animais inicialmente infetados por exemplares de *conorhini,* provenientes da mesma zona onde faziamos as atuais pesquizas.

Imediatamente apoz esta verificação inoculámos duas cobaias e um sagui com sangue

ten konnte; eine sehr konstante und oft beträchtliche Milzschwellung, welche nicht auf Malaria zurückgeführt werden konnte; weniger häufig Leberschwellung; endlich verschiedene funktionelle Störungen, besonders des Nervensystems, wobei namentlich der prekäre Zustand der Intelligenz auffiel, so dass sogar viele Fälle von wirklicher Imbecillität vorkamen.

Aus sorgfältig erhobenen Informationen entnahm ich, dass in der Zone die Kindersterblichkeit eine grosse war, wobei von den Einwohnern Konvulsionen als besonders häufig und auf verschiedenen Altersstufen auftretend angegeben und diesem Symptome die meisten Todesfälle unter den Kindern zugeschrieben wurden. Entweder sterben die Kinder in dieser Weise, unter vorherrschenden Symptomen von Seiten des Nervensystems, oder sie zeigen in den letzten Stadien der tödlichen Erkrankung eine wirkliche Wassersucht, welche mit derjenigen bei Ankylostomiasis vergleichbar ist. Letztere Tatsache rechtfertigt die beiden Benennungen, unter welchen die Krankheit unter den Einwohnern bekannt ist, nämlich «*Opilação*» und «*Canguary*», Namen welche von dem Volke in anderen Zonen, wo dieselbe herrscht, der Ankylostomiasis gegeben werden. Ich glaubte, den Einfluss letzterer Krankheit bei dem beobachteten Krankheitsbilde ausschliessen zu müssen und habe deshalb, ungeachtet des Fehlens klinischer Zeichen dieser Wurmkrankheit, bei Kranken mit den geschilderten Erscheinungen zahlreiche Fäkaluntersuchungen vorgenommen, welche ein negatives Resultat ergaben.

Die Infektion des Menschen durch den Flagellaten wurde von mir in folgender Weise festgestellt:

In verschiedenen menschlichen Wohnungen, wo «Barbeiros» vorkamen, in deren Darme ich reichlich *Crithidien*-formen gefunden hatte, machte ich eine erstmalige Blutuntersuchung, welche bei Patienten mit der oben angeführten Symptomatologie besonders eingehend war. Bei dieser ersten Untersuchung wurde, wie hier bemerkt sei, von jedem Patienten nur ein Blutstropfen im feuchten Deckglaspräparat untersucht, was das negative Resultat, zu dem ich gelangte, einigermassen

retirado, por punção venoza, da creança. As cobaias morreram no 6.º dia apoz a inoculação e no pulmão de ambas encontrámos fórmas parazitarias, inteiramente identicas ás que temos estudado no ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. O *Callithrix*, 8 dias depois da inoculação aprezentou na circulação periferica flajelados de morfolojia identica a do tripanozómida estudado.

Outro rezultado pozitivo foi obtido quazi simultaneamente, por inoculação do sangue de creança de 2 anos em duas cobaias. Tratava-se de doente muito anemiado, com volumozos ganglios axilares, cervicais e inguinais, esplenomegalia, edema sub-palpebral, decadencia organica acentuada. Este doente era frequentes vezes acometido de acessos febris. Em exame de gotas de sangue periferico, entre lamina e laminula, assim como em exame do material retirado dos ganglios, nada obtivemos, pelo que dado o aspeto clinico caracteristico do doente, rezolvémos tentar a inoculação de animais sensiveis. As duas cobaias morreram, uma dellas no 2.º dia, sem que podessemos verificar a prezença de parazitos, parecendo ter sido acidental a morte; a outra cobaia, porém, morreu no 9.º dia apoz a inoculação e no pulmão desta verificámos grande abundancia de fórmas parazitarias inteiramente identicas ás das cobaias da experiencia anterior. Não encontrámos no sangue periferico desta cobaia, em exame rapido, flajelados, o que significa o estado inicial da infeção e a pequena quantidade de material pesquizado.

Terceiro rezultado pozitivo foi-nos fornecido ainda por inoculação em cobaia. Tratava-se de creança de 6 anos, em condição morbida intensa, espressando-se em profunda anemia, edemas generalizados, perturbações funcionais do sistema nervozo. Ao exame fizico encontrámos grandes ganglios cervicais e axilares. O exame do sangue, em epoca de apirexia, exame de gota entre lamina e laminula, foi de rezultado negativo, pelo que inoculámos cobaia. Esta, 20 dias depois, aprezentava flajelados na circulação periferica e 2 mezes depois era intensa a infeção, tendo sobrevivido até agora o animal.

rechtfertigt. Als ich jedoch nach vier Tagen zur Behandlung eines schwer kranken Kindes gerufen wurde, dessen Blut ich schon zuvor untersucht hatte, konstatierte ich die Gegenwart lebender Flagellaten im peripheren Blute. In nach GIEMSA gefärbten Blutausstrichen erkannte ich in dem Flagellaten ein Trypanosoma, das morphologisch gänzlich übereinstimmte mit dem *Schizotrypanum cruzi*, dessen Biologie ich im Laboratorium studiert hatte und zwar an Tieren, welche ursprünglich durch *Conorhinus*-exemplare infiziert worden waren, die aus der Zone stammten, in welcher wir zur Zeit unsere Untersuchungen machten.

Nach diesem Befunde impfte ich sofort zwei Meerschweinchen und ein *Callithrix*-äffchen mit durch Venenpunktion entnommenem Blute des Kindes. Die Meerschweinchen starben am sechsten Tage nach der Impfung und in den Lungen beider wurden parasitäre Formen gefunden, welche mit den, im Entwicklungsstadium von *Schizotrypanum cruzi* studierten, vollkommen übereinstimmten. Die *Callithrix* zeigte acht Tage nach der Impfung im peripherischen Blutkreislaufe Flagellaten mit denselben Formen, wie die der studierten Trypanosomide.

Ein anderes positives Resultat wurde fast gleichzeitig erzielt, indem das Blut eines acht Jahre alten Kindes zwei Meerschweinchen eingeimpft wurde. Es handelte sich um einen Patienten mit starker Anämie, voluminösen Axillar-, Cervical- und Inguinaldrüsen, Milzschwellung, Oedem der Augenlider und ausgesprochenem organischen Verfall. Er litt auch an häufigen Fieberanfällen. Bei der Untersuchung von Tropfen des peripherischen Blutes im feuchten Präparate und ebenso bei einer solchen von Lymphdrüsenmaterial fand ich nichts, weshalb ich, im Hinblick auf das charakteristische klinische Bild des Patienten beschloss, die Uebertragung auf sensible Tiere zu versuchen. Beide Meerschweinchen starben, eines davon am zweiten Tage, ohne dass ich das Vorhandensein von Parasiten konstatieren konnte, während der Tod zufällig erfolgt zu sein schien; das andere Meerschweinchen starb dagegen am neunten Tage nach der Einimpfung und in den Lungen desselben fand

Convém afirmar a absoluta impossibilidade de infeção acidental dos animais em experiencia, os quais se achavam continuamente em gaiola de téla fina, ao abrigo de picadas de qualquer hematofago. E por outro lado, estando estes rezultados inteiramente de acordo com experiencias de laboratorio que obedeceram ao maior rigor de tecnica, izentas de qualquer cauza de erro, foram elles decizivos, dando marjem, desde logo, a concluzões definitivas.

O flajelado obtido no *Callithrix* por inoculação de sangue humano parazitado acha-se no laboratorio e tem servido para a continuação de novas pesquizas. Os *Callithrix* morrem um mez e meio apoz a inoculação com flajelados no sangue periferico e fórmas parazitarias no pulmão, identicas ás da scobaias.

Vamos referir a historia clinica dos dois doentes, em cujo sangue verificámos a prezença do *Schizotrypanum cruzi.*

I. Berenice, de côr branca, 2 anos de idade, brazileira, nacida na mesma zona onde se encontra. A anamnese ensina: Auzencia completa de fenomenos morbidos até a prezente molestia, cujo inicio é referido á 4 mezes antes. As primeiras manifestações morbidas constaram de acessos febris intensos intermitentes, entrando a creança, desde essa ocazião, em franca decadencia organica. Depois dos primeiros ataques de reação febril a doente tinha periodos longos de apirexia, interrompidos de acessos febris de pouca duração. Não foram referidas perturbações funcionais do sistema nervozo.

Condição morbida atual: Palidez consideravel, aspeto *bouffu,* edema sub-palpebral constante e edemas fugazes na testa e membros. No primeiro exame, quando auzentes parazitos do sangue periferico, a doente achava-se apiretica; quatro dias depois, porém, quando encontrámos flajelados, a creança tornou-se febril, atinjindo a temperatura 40°, no primeiro acesso; a este seguiram-se tres outros nos dias consecutivos, começando a elevação de temperatura depois de meio dia e prolongando-se pela noite. Havia, nas primeiras horas do dia, algumas horas de apirexia.

ich eine grosse Anzahl parasitärer Formen, welche mit denjenigen des Meerschweinchens im obigen Versuche vollständig übereinstimmten. Bei einer kurzen Untersuchung fand ich im peripheren Blute dieses Meerschweinchens keine Flagellaten, was auf das Anfangsstadium der Infektion und geringe Menge des untersuchten Materials deutet.

Ich erhielt noch ein drittes positives Resultat durch die Impfung eines Meerschweinchens. Es handelte sich um ein sechsjähriges Kind in ausgesprochenem Krankheitszustande; derselbe äusserte sich in starker Anämie, generalisierten Oedemen und funktionellen Störungen von Seite des Nervensystems. Bei der Untersuchung konstatierte ich grosse Cervical- und Axillardrüsen. Die einmalige Untersuchung eines Blutstropfens unter dem Deckglase, welche während der Apyrexie vorgenommen wurde, ergab nichts, weshalb ein Meerschweinchen geimpft wurde. Dieses zeigte zwanzig Tage später Flagellaten in der peripherischen Zirkulation und zwei Monate darauf war die Infektion eine sehr lebhafte; doch ist das Tier bisher am Leben geblieben.

Es ist hier auch am Platze, die absolute Unmöglichkeit einer zufälligen Infektion der Versuchstiere anzuführen, welche sich, vor Stichen geschützt, in Käfigen von feiner Drahtgaze befanden.

Diese Ergebnisse stehen nun völlig im Einklange mit Laboratoriumsexperimenten, welche mit sorgfältigster Technik ausgeführt wurden und frei von jeder Fehlerquelle sind; so waren sie entscheidend und gestatteten ohne weiteres bestimmte Schlüsse.

Die Flagellaten, welche bei der *Callithrix* durch Einspritzung parasitenhaltigen menschlichen Blutes erhalten wurden, werden stets im Laboratorium gezüchtet und haben zur Fortsetzung neuer Versuche gedient. Der Affe starb $1\,^1/_2$ Monate nach der Inokulation, mit Flagellaten im peripheren Blute und Parasitenformen in den Lungen, welche mit denjenigen der Meerschweinchen übereinstimmten.

Ich gebe hier die klinische Geschichte der beiden Patienten, in deren Blute ich das Vorhandensein von *Schizotrypanum cruzi* konstatierte.

Exame fizico: Grande numero de ganglios cervicais, alguns bem volumozos, nas rejiões sub-maxilar, esterno cleido-mastoidea e na infra-clavicular. Diversos ganglios volumozos nas rejiões axilares, inguinais e crurais. Baço crecido, estando perceptivel, pela apalpação, sob a arcada costal. Area de matidez esplenica muito aumentada. Certo gráu de esplenaljia. Hepatomegalia. O figado está aumentado para cima e para baixo. Dôr á pressão do orgão, abaixo do rebordo costal e tambem no epigastrio. Aparelho urinario: Leves vestijios de albumina na urina. Micções normais. Sistema nervozo: Grande ajitação e delirio nos periodos de maxima elevação termica.

Sangue: Dia 14-4-09 — Tripanozómidas no sangue periferico, em numero não muito grande, sendo vistos de 15 a 20 em gota, entre lamina e laminula.

Dia 17-4-09 — A doente esteve febril durante a noite; tripanozómidas no sangue periferico, em numero sensivelmente menor que no exame anterior.

Dia 23-4-09 — A doente achava-se apiretica, desde 2 dias; tripanozómidas em menor numero, sendo com dificuldade verificaveis nos preparados vivos. Foi esta a ultima pesquiza que nos foi dado fazer nesta doente.

II. José, de 8 anos, côr preta, nacido na zona. A anamnese refere: Estado morbido desde 2 anos, espressando-se em grande fraqueza geral, edemas mais ou menos demorados na face e membros inferiores, acessos febris periodicos. Estado atual: Esteve febril 8 dias antes do nosso exame e no momento achava-se apiretico, notando-se, porém, salientes, os seguintes sintomas morbidos: edema palpebral, grande palidez com aspeto *bouffu,* ganglios cervicais, axilares e inguinocrurais engurjitados. Esplenomegalia acentuada e tambem hepatomegalia. Auzencia de perturbações funcionais do sistema nervozo.

Sangue: Dia 14-4-09 — Exame de preparado vivo, entre lamina e laminula, negativo; assim o exame de material retirado pela punção ganglionar.

I. Berenice, zweijährige, weisse Brasilianerin, am Orte der Untersuchung geboren. Die Anamnese ergiebt ein vollständiges Fehlen von Krankheitserscheinungen bis zum Beginne der gegenwärtigen Affektion, welche auf vier Monate früher angegeben wird. Die ersten Krankheitserscheinungen bestanden in sehr heftigen intermittierenden Fieberanfällen, wobei sich an der Kranken von dieser Zeit an ein deutlicher organischer Verfall zeigte. Nach den ersten Fieberanfällen hatte die Patientin längere Perioden von Apyrexie, die von kurz dauernden febrilen Accessen unterbrochen wurden. Funktionelle Störungen von Seite des Nervensystems wurden nicht angegeben.

Gegenwärtiger Krankheitsbefund: Bedeutende Blässe, gedunsenes Aussehen, beständiges Oedem der Augenlider und flüchtige Oedeme an Stirne und Extremitäten. Bei der ersten Untersuchung, als die Parasiten im peripheren Blute fehlten, war sie apyretisch; vier Tage darauf jedoch, als wir die Parasiten in demselben fanden, wurde das Kind fieberisch, wobei die Temperatur im ersten Anfalle 40 Grad erreichte; auf diesen folgten in den nächsten Tagen drei andere Accesse, bei welchen die Temperatursteigerung nach der Mittagsstunde eintrat und sich bis in die Nacht verlängerte. Zu Anfang des Tages gab es einige fieberfreie Stunden.

Untersuchung der Kranken: Grosse Anzahl von, zum Teil voluminösen, Drüsen am Halse, in den Submaxillar-, Sterno-cledomastoideal- und Supraclaviculargegenden. Verschiedene beträchtliche Drüsenschwellungen in den Axillar-, Inguinal- und Cruralregionen. Milz vergrössert, unter dem Rippenbogen der Palpation zugänglich; die Dämpfung deutlich erweitert, auch ein gewisser Grad von Splenalgie ist vorhanden. Leber vergrössert und zwar sowohl nach oben, wie nach unten. Beim Druck auf dieselbe unter dem Rippenbogen und im Epigastrium wird Schmerz empfunden.

Harnapparat: Leichte Spuren von Albumin im Urin. Mictionen normal.

Nervensystem: Grosse Aufregung und Delirien während der Perioden höchster Temperatursteigerung.

Blut: 14-IV-09. Trypanosomen im peri-

Dia 17-4-09 — Negativo o exame de gota entre lamina e laminula. Inoculadas nesse dia 2 cobaias com sangue obtido por punção venoza, morreram 12 dias depois e aprezentaram no pulmão grande numero de formas esquizogonicas. Este doente, como a precedente, continua sob observação clinica.

III. JOAQUINA, de 6 annos, do sexo feminino, côr parda. Doente desde 6 mezes com acessos febris irregulares. Grande decadencia organica. Edema generalizado mais acentuado no rosto e nos membros inferiores. Ganglios do pescoço, especialmente os da rejião cleido-mastoidéa, muito volumozos. Baço aumentado e dolorozo á palpação. Insonias repetidas e ajitação noturna.

Sangue: Pesquiza de gota entre lamina e laminula, negativa. Verificação da infeção pela prezença de flajelados em cobaia inoculada.

Morfolojia e evolução do Schizotrypanum cruzi no organismo dos vertebrados.

No sangue periferico dos animais infetados o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta duas fazes distintas de evolução, a de organismos intraglobulares e a de flajelados livres no plasma.

No inicio da infeção, isto é, quando tem logar o aparecimento dos primeiros flajelados no sangue periferico, as fórmas intraglobulares são mais abundantes, sendo nesta faze, ás vezes, as unicas encontradas na circulação periférica. O aspeto dos tripanozómidas intra-globulares é variavel: ora se acham elles inteiramente incluidos no globulo vermelho, de modos diversos, formando ás vezes circulo, ou colocados transversalmente, ora têm parte incluida na hemátia e outra livre no plasma, ora, finalmente, o que é aspeto muito frequente, são vistos prezos á hemátia só pelo blefaroplasto. A incluzão de tripanozómidas em hemátias, mais abundantes no inicio da infeção é vista em menor numero, em qualquer outra faze da molestia, o que indica ser aquelle fenomeno condição biolojica no ciclo evolutivo do protozoario.

pherischen Blute in nicht sehr grosser Anzahl, indem etwa 15—20 in einem Tropfen zwischen Objectträger und Deckglass gesehen werden.

17-IV-09. Patientin hat während der Nacht Fieber gehabt; Trypanosomen im peripherischen Blute in deutlich geringerer Anzahl, als bei der letzten Untersuchung.

23-IV-09. Die Patientin ist seit zwei Tagen ohne Fieber; Trypanosomen in geringerer Zahl und im frischen Präparate nur mühsam nachzuweisen. Es war dies die letzte Untersuchung, welche ich bei der Kranken machen konnte.

II. JOSÉ, achtjähriger Mulattenjunge, in der Zone geboren.

Die *Anamnese* ergiebt:

Seit zwei Jahren ein krankhafter Zustand, der sich in grosser allgemeiner Schwäche, mehr oder weniger dauernden Oedemen im Gesicht und an den unteren Gliedmassen, sowie in periodischen Fieberanfällen äussert.

Gegenwärtiger Zustand: Acht Tage vor unserer Untersuchung hat er Fieber gehabt, gegenwärtig ist er apyretisch, dagegen treten folgende Krankheitssymptome deutlich hervor: Oedem der Augenlider, grosse Blässe mit gedunsenem Aussehen, angeschwollene Cervical-, Axillar- und Inguinocruraldrüsen. Ausgesprochene Splenomegalie und auch Leberschwellung vorhanden. Funktionelle Störungen von Seite des Nervensystems nicht nachzuweisen.

Blut: 14-IV-09. Untersuchung im frischen Zustande, negativ; ebenso eine solche von durch Drüsenpunktion erhaltenem Material.

17-IV-09. Untersuchung eines Bluttropfens im frischen Präparate negativ. Zwei mit, durch Venenpunktion erhaltenem, Blute geimpfte Meerschweinchen starben nach 12 Tagen und zeigten in den Lungen grosse Mengen von Schizogonieformen. Der Patient bleibt, wie der vorige, in klinischer Beobachtung.

III. JOAQUINA, sechsjähriges Mulattenmädchen. Seit sechs Monaten krank, mit unregelmässigen Fieberanfällen. Starker organischer Verfall. Allgemeine Oedeme, im Gesichte und an den unteren Gliedmassen mehr ausgesprochen. Ganglien des Halses, besonders der Cleido-mastoidealregion, sehr volumiös. Milz geschwollen und auf Druck empfindlich. Wie-

Desde o estádio intra-globular é bem saliente no tripanozómida dualismo morfolojico, permanecendo este em todas as fazes do ciclo evolutivo. Este dimorfismo, que se espressa mesmo nos preparados defeituozamente fixados apóz dessecamento e que melhor se carateriza, de modo exato, quando são os preparados fixados humidos, consta principalmente de diversidade de fórma e de dimensões do blefaroplasto e do nucleo, como será verificado nas descrições seguintes.

Aprezentando o tripanozómida algumas variantes morfolojicas conforme o mamifero infetado pensámos mais conveniente estudar a morfolojia do parazito adulto nos trez principais hospedeiros vertebrados, homem, sagui e cobaias, em seguida descrevendo as diversas fazes do ciclo evolutivo na cobaia e no sagui, principais animais que serviram para nossas experiencias.

Schizotrypanum cruzi no sangue periferico do homem.

Os exames do parazito no sangue de nossa primeira doente só foram feitos com fixação, apoz desecamento, e coloração pelo metodo de GIEMSA, o que ocaziona certa deficiencia nos dados morfolojicos obtidos. Verdade é que temos conhecimento exato da morfolojia do tripanozómida humano inoculado no *Callithrix,* conhecimento fornecido pela fixação a humido e coloração pela hematoxylina ferrea (metodo de ROSENBUSCH) o que vem garantir a verdade de nossa descrição.

No sangue humano observámos dois aspetos morfolojicos bem distintos do tripanozómida:

Uma das fórmas aprezenta grande blefaroplasto ovoide, colocado muito proximo ou exatamente na extremidade posterior do parazito, com o maior diametro transversal. A fixação a seco determina ver-se, de regra, saliencias laterais do blefaroplasto, o qual se aprezenta com aspeto de barra de cromatina transversal, com as partes laterais não cercadas de plasma. E' frequente observar-se, nesta fórma, como apendice do blefaroplasto

derholte Schlaflosigkeit und nächtliche Aufregung.

Blut: Untersuchung eines frischen Präparates negativ. Feststellung der Infektion durch Auffinden von Flagellaten bei einem geimpften Meerschweinchen.

Morphologie und Entwicklung des Schizotrypanum cruzi im Organismus der Wirbeltiere.

Im peripherischen Blute der infizierten Tiere zeigt das *Schizotrypanum cruzi* zwei verschiedene Entwicklungsphasen: diejenige des intraglobulären Organismus und die der im Blutplasma frei vorkommenden Flagellaten. Zum Beginne der Infektion, d. h., wenn die erstèn Flagellaten im Blute erscheinen, sind die intraglobulären Formen zahlreicher vorhanden und nicht selten in dieser Phase die einzigen, welche in dem peripheren Blutkreislauf gefunden werden. Ihr Aussehen ist ein wechselndes: bald befinden sie sich im roten Blutkörperchen vollständig eingeschlossen, indem sie manchmal kreisförmig, manchmal transversal gelagert sind, bald haben sie einen Teil im Innern des Blutkörperchens und den andern frei im Plasma oder endlich, was sehr häufig zu sehen ist, sind sie nur durch den Blepharoplasten mit den Hämatien verbunden. Der Einschluss der Trypanosomen in den Blutkörperchen, welcher zu Anfang der Infektion häufiger ist, wird in den anderen Phasen der Krankheit seltener gesehen, was darauf hinweist, dass diese Erscheinung einen biologischen Zustand im Entwicklungszyklus des Protozoons darstellt.

Schon vom intraglobulären Stadium an, zeigt sich beim *Schizotrypanum* sehr deutlich ein morphologischer Dualismus, welcher in allen Entwicklungsphasen weiter besteht. Dieser Dimorphismus, welcher auch in getrockneten und mangelhaft fixierten Präparaten zum Ausdruck kommt und sich genauer und deutlicher kennzeichnet, wenn der Parasit feucht fixiert wird, zeigt sich besonders in der Verschiedenheit von Form und Dimensionen des Kernes und Blepharoplasten, wie man aus den folgenden Beschreibungen ersehen kann.

segundo elemento cromatico, a elle intimamente ligado e que corresponde ao fuzo central e ao rizoplasto bem apreciavel nos preparados fixados humidos. O nucleo principal tem geralmente fórma ovoide ou se aprezenta como longa faixa de cromatina, colocada no sentido lonjitudinal, aspeto este que parece indicar faze atrazada na evolução do nucleo. E' frequente observar-se, no interior do nucleo, corpusculo de cromatina mais intensamente córado e que corresponde ao cariozoma.

A membrana ondulante aprezenta-se com variavel numero de ondulações dependentes, naturalmente, das condições de movimento do parazito no momento da fixação. O flajelo, cuja orijem apreciavel é ou o proprio blefaroplasto ou a o elemento cromatico já citado apenso áquelle, passa de uma para outra extremidade do organismo, geralmente nas imediações do nucleo ou exatamente ao nivel deste e aprezenta porção livre de comprimento variavel, sempre mais curta que na outra fórma que vamos em seguida descrever. A extremidade anterior do parazito é afilada, sendo o flajelo livre acompanhado até certa altura por delgado prolongamento do plasma.

A outra fórma, observada no sangue humano distingue-se da precedente, sobretudo, pelo tamanho e aspeto do blefaroplasto e do nucleo.

Aqui o blefaroplasto é mais ou menos esferico situado na extremidade posterior do organismo e muito menor que a da fórma anterior não aprezentam de regra, pela tecnica uzada, apendice cromatico apreciavel.

O nucleo é tambem esferico, aprezenta a cromatina menos condensada, sendo, ás vezes, possivel observar os elementos constitutivos della separados em diversos cromozomios. Finalmente, nesta fórma o plasma aprezenta largura sensivelmente maior que na fórma anterior.

Observámos ainda, no sangue de nossa doente, um outro aspeto de tripanozómida no qual o blefaroplasto, ao contrario do que acontece no aspeto normal, acha-se muito dis-

Da die Trypanosomiden, je nach der Art des geimpften Säugetieres, einige Formverschiedenheiten zeigen, halte ich es für angebracht, die Morphologie des Parasiten in den drei Hauptwirten Mensch, *Callithrix* und Meerschweinchen zu studieren und hierauf die verschiedenen Entwicklungsphasen im Meerschweinchen und Pinseläffchen zu beschreiben, da diese Tiere hauptsächlich zu meinen Versuchen dienten.

Das Schizotrypanum cruzi im peripherischen Blute des Menschen.

Die Untersuchung des Parasiten im Blute unserer ersten Kranken wurden mit getrockneten, fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten gemacht, was eine gewisse Mangelhaftigkeit der erhaltenen morphologischen Befunde erklärt. Allerdings kannte ich die Morphologie des menschlichen Parasiten genau, da ich sie an den geimpften Aeffchen studiert hatte, wobei feuchte Fixation und Färbung mit Eisenhämatoxylin (Methode von ROSENBUSCH) zur Anwendung kam, was die Richtigkeit unserer Beschreibung garantiert. Im menschlichen Blute beobachtete ich zwei deutlich verschiedene Formen des Trypanosomiden.

Eine der Formen zeigt einen grossen, eiförmigen Blepharoplasten, welcher sehr nahe oder ganz am Hinterende des Parasiten liegt und seinen grössten Durchmesser in transversaler Richtung hat. In Folge der trockenen Fixation bilden sich in der Regel seitliche Hervorragungen des Blepharoplasten, der als transversaler Chromatinbalken erscheint, bei welchen die beiden Enden nicht vom Plasma eingefasst sind. Bei dieser Form beobachtet man häufig ein zweites Chromatinelement, das als innig verbundenes Anhängsel des Blepharoplasten erscheint und der Centralspindel und dem Basalkorn entspricht, was in feucht fixiertem Präparate sehr deutlich wird. Der Hauptkern hat gewöhnlich eine ovale Form oder erscheint als langes, in Längsrichtung gelagertes Chromatinband; die letzte Form scheint eine frühere Phase in der Entwicklung des Kernes anzudeuten. Man erkennt häufig im Innern des Nucleus ein stärker ge-

tante da extremidade posterior do organismo. Nesta fórma o nucleo aprezenta-se sempre como longa faixa lonjitudinal. Acreditamos tratar-se aqui de fórmas de evolução, nas quais a emigração do blefaroplasto para a extremidade do parazito vae-se realizando. Identico aspeto observámos algumas vezes em cobaias, inoculadas com parazitos vindos dos conorrinos.

Não raro é observar-se no sangue humano fórmas do tripanozómida incluidas nas hemátias, sendo demonstrativo deste fato a figura 28 da Est. 10.

Morfolojia do Schizotrypanum cruzi, de orijem humana, no sangue do Callithrix penicillata.

A inoculação do sangue de nossa doente BERENICE em *Callithrix penicillata* forneceu-nos intensa infeção, com abundancia do parazito no sangue periferico, de modo a termos podido estudar minuciozamente a morfolojia do tripanozómida.

Uzámos, como processo de tecnica, além da coloração pelo metodo de GIEMSA, o recente processo de ROSENBUSCH, do qual tivemos conhecimento pelo Dr. MAX HARTMANN. Consta do seguinte o metodo de coloração de ROSENBUSCH: Fixação a humido, pelo sublimado-alcool, segundo SCHAUDINN, durante vinte minutos ou meia hora; passajem dos *frottis* pelos alcooles a 70º e 95º, permanecendo de 10 a 15 minutos em cada; lavajem com agua distilada e permanencia de duas horas em solução a 3,5 % de alumen ferrico; nova lavajem em agua distilada e coloração, durante 5 minutos, em solução a 1 % de hematoxilina em alcool a 96 %, adicionada de algumas gotas de solução concentrada de carbonato de litio; lavajem dos preparados em agua corrente e diferenciação em solução aquoza a 2,5 % de alumen ferrico; dezhidratação e montajem no balsamo. A mistura córante deve aprezentar a côr de vinho tinto, sendo necessario que a solução alcoolica de hematoxilina tenha sido preparada com antecedencia nunca menor de 4 semanas. A parte mais delicada do

färbtes Chromatinkörperchen, welches dem Caryosom entspricht.

Die undüllierende Membran zeigt eine wechselnde Anzahl von Ausbuchtungen, die natürlich von den Bewegungzuständen abhängen, in welchen der Parasit fixiert wurde. Die Geissel, welche, so weit man sehen kann, vom Blepharoplast selbst oder dem erwähnten Chromatinelement, welche sich an diesen anschliesst, entspringt, verläuft quer von einem zum anderen Ende des Organismus, gewöhnlich sehr nahe oder direkt im Niveau des Kernes und zeigt einen freien Teil, von wechselnder Länge, aber immer kürzer, als in der andern Form, die ich noch näher beschreiben werde. Das Vorderende des Parasiten ist zugespitzt, indem die freie Geissel bis zu einer gewissen Höhe von einem dünnen Protoplasmafortsatz begleitet ist.

Die zweite im menschlichen Blute beobachtete Form unterscheidet sich von der vorigen besonders durch Grösse und Aussehen des Blepharoplasten und des Kernes.

Hier ist der Blepharoplast mehr oder weniger rund, am Hinterende des Organismus liegend und bedeutend kleiner als bei der vorigen Form; auch zeigt er in der Regel bei der angewandten Technik kein deutliches Chromatinhängsel. Auch der Nucleus ist rund und das Chromatin erscheint weniger verdichtet, so dass man manchmal seine Zusammensetzung aus verschiedenen Chromatinkörnern unterscheiden kann. Endlich zeigt bei dieser Form das Plasma eine deutlich grössere Breite, wie in der vorigen.

Ich habe ausserdem im Blute unserer Patientin noch eine Form des Trypanosoma beobachtet, in welcher der Blepharoplast im Gegensatz zum gewöhnlichen Befunde sich sehr weit vom Hinterende des Organismus befindet; dabei zeigt sich der Kern immer als ein langes und längsgerichtetes Chromatinband. Ich halte dies für eine Entwicklungsform, in welcher die Wanderung des Blepharoplasten nach dem Hinterende des Parasiten sich eben vollzieht; einen ähnlichen Anblick beobachtete ich einigemale bei Meerschweinchen, welche mit von *Conorhinus* stammenden Parasiten geimpft waren.

processo é a diferenciação; desta depende, essencialmente, o sucesso dos preparados. Por outro lado, cumpre observar que alguns protozoarios rezistem mais á diferenciação pelo alumen, quando outros deixam escapar mais depressa a materia córante; pelo que, o gráu de diluição da substancia diferenciadora deverá variar e será conhecido para cazo especial, de acordo com ensaios realizados.

Obtivemos com este metodo de pesquizas, os melhores rezultados nas diversas fazes da evolução, tendo chegado ao conhecimento das mais finas estruturas do tripanozómida, não apreciaveis pelos outros metodos.

No *Callithrix* pelo metodo de GIEMSA, o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta os aspetos morfolojicos descritos no sangue do doente, sendo de notar, porém, que nas fórmas de grande blefaroplasto este se aprezenta ainda maior que no sangue humano. Interessantes foram os rezultados fornecidos pelo processo de ROSENBUSCH: Bem evidente é aqui o dimorfismo do tripanozómida e, em vista do processo de fixação uzado, devemos considerar os aspetos morfolojicos verificados como absolutamente verdadeiros e não determinados por acidentes de tecnica.

Uma das fórmas do tripanozómida mostra grande blefaroplasto, quazi sempre ovoide, situado proximo da extremidade posterior do organismo; neste blefaroplasto distingue-se grande corpusculo central, esferico ou ovoide, intensamente córado, e zona externa clara, limitada por membrana delgada, de contorno, ás vezes, regular. E' a zona de suco nuclear do nucleo-blefaroplasto, como acaba de demonstrar ROSENBUSCH para diversos tripanozômos. Nos exemplares cuja fixação e coloração tenham sido bem sucedidas, observa-se, partindo do blefaroplasto, quazi sempre em ligação com o cariozoma deste, cone fibrilar de aspeto difuzo, na extremidade do qual ha pequeno corpusculo intensamente córado. Esta ultima estrutura é o fuzo central e o corpusculo da extremidade, ponto de emergencia do flajelo, é o corpusculo bazal. Esse aspeto corresponde ás observações de ROSENBUSCH; aqui, porém, com muito maior nitidez.

Nicht selten beobachtet man im menschlichen Blute auch Trypanosomenformen, die in den Blutkörperchen eingeschlossen sind, wie die Figur 28, Taf. 10 zeigt.

Morphologie des von Menschen stammenden Schizotrypanum cruzi in der Callithrix penicillata.

Die Ueberimpfung des Blutes unserer Patientin BERENICE auf eine *Callithrix penicillata* ergab eine intensive Infektion mit zahlreichen Parasiten im peripherischen Blute, so dass ich die Morphologie des *Schizotrypanum* genau studieren konnte.

Von technischen Verfahren benützte ich neben der Methode von GIEMSA auch die neue von ROSENBUSCH, deren Kenntnis ich den Vorlesungen von Dr. MAX HARTMANN verdanke. Dieselbe besteht in Folgendem: feuchte Fixierung durch Sublimalalkohol nach SCHAUDINN während 20 bis 30 Minuten, Durchführen der Ausstriche durch Alkoholgemische von 70 bis 95 Grad (bei einem Aufenthalte von 10 bis 15 Minuten in jedem derselben) und zurück; Abspülen im destillierten Wasser und zweistündigem Verweilen in einer 3,5 % Eisenalaunlösung; abermaligem Abspülen in aqua destillata und Einlegen während eines Zeitraums von 5 Minuten in eine 1 % Lösung von Hämatoxylin in 96 % Alkohol, welcher einige Tropfen einer konzentrierten Lithiumkarbonatlösung zugesetzt werden. Hierauf werden die Ausstrichpräparate in fliessendem Wasser gewaschen und in einer 2,5 % wässerigen Eisenalaunlösung differenziert; dann wird das Präparat deshydratiert und in Balsam eingeschlossen. Die Farbelösung soll eine Rotweinfarbe zeigen und die Hämatoxylinlösung wenigstens vier Wochen früher hergestellt sein.

Der delikateste Teil des Verfahrens ist die Differenzierung und davon hängt hauptsächlich das gute Resultat ab. Jedoch muss bemerkt werden, dass einige Protozoen der Differenzierung durch Alaun länger widerstehen, während andere den Farbstoff schneller abgeben; deswegen muss der Verdünnungsgrad der differenzierenden Substanz wechseln und sich in jedem Falle nach zuvorgemachten Ver-

O nucleo principal nesta fórma é ovoide, com membrana muito regular, bastante espessa, e com grande cariozoma esferico no centro. A zona de suco nuclear é quazi sempre clara, inteiramente sem cromatina, ou aprezenta raras e finas trabeculas desta substancia.

A membrana ondulante, cuja largura é igual a pouco mais do terço da largura do plasma, aprezenta pequeno numero de ondulações e não deixa, por este processo, perceber estrutura especial. O flajelo parte, em alguns exemplares, do corpusculo bazal, situado no apice do cone fibrilar; ás vezes, porém, não é perceptivel o fuzo central nem o corpusculo bazal, emerjindo, então, o flajelo diretamente da membrana do nucleo-blefaroplasto. Pode-se supor que, em tais cazos, o fuzo central dezaparece e que o corpusculo bazal se torne invizivel em consequencia de enrugamento. O plasma aprezenta, ás vezes, estrutura alveolar bem nitida; em alguns exemplares, porém, mostra estrutura mal caraterizada, de aspeto difuzo, ou mais ou menos reticular. As extremidades do parazito são afiladas, ponteagudas.

A outra forma distingue-se da precedente pelo tamanho muito menor do blefaroplasto e pelo aspeto do nucleo. Aqui, o nucleo-blefaroplasto, ora esferico, ora ovoide, aprezenta ainda um corpusculo central (cariozoma), menor que o da forma precedente, cercado de zona clara, em cuja periferia existe circulo de substancia cromatica, com o aspeto de membrana. Partindo do cariozoma do blefaroplasto, é geralmente vizivel o fuzo central, com o corpusculo bazal na extremidade.

O nucleo é esferico, com cariozoma central menor que na forma precedente; zona de suco nuclear clara, sem substancia cromatica e membrana espessa. E' frequente nesta forma observar-se condição nuclear curioza, similar á verificada por JOLLOS nos coccidios e por ZÜLZER nos heliozoarios. Os nucleos (Est. 13, fig. 1, 5, 6 e 7) aprezentam-se muitas vezes em estado de mitoze sem que seja observado qualquer outro estádio de divizão nos outros pontos do organismo celular. E' mitoze precoce do nucleo, precedendo a esquizogonia do parazito, fenomeno atualmente conhecido em citosuchen richten. Mit dieser Untersuchungsmethode erhielt ich bei verschiedenen Entwicklungsstadien die besten Resultate und erkannte die feinsten Strukturen des *Schizotrypanum*, welche bei den anderen Methoden nicht zu beobachten waren.

Nach der Methode von GIEMSA zeigt das *Schizotrypanum cruzi* die im Blute der Patientin geschilderten Formen auch bei der *Callithrix*; doch ist zu bemerken, dass bei den Formen mit grossen Blepharoplasten dieser noch grösser erscheint, als im menschlichen Blute. Sehr interessant waren die Ergebnisse der Methode von ROSENBUSCH: hier zeigt sich der Dimorphismus des Trypanosomiden sehr deutlich und im Hinblick auf die angewandte Fixierungsart kann man die beobachteten morphologischen Bilder als natürliche und nicht durch technische Zufälligkeiten verursachte ansehen.

Eine der Trypanosomenformen zeigt einen grossen, fast immer eiförmigen Blepharoplasten am Hinterende des Organismus, in welchem man einen grossen runden oder eiförmigen Centralkörper erkennt, welcher intensiv gefärbt ist; ferner eine äussere helle Zone, welche durch eine dünne Membran mit nicht selten ganz regelmässigem Umrisse begrenzt wird. Es ist dies die Kernsaftzone des Blepharoplastkernes, wie dies ROSENBUSCH neuerdings für verschiedene Trypanosomen gezeigt hat.

An solchen Exemplaren, bei welchen Fixation und Färbung gut gelungen sind, beobachtet man vom Blepharoplasten ausgehend und fast immer in Verbindung mit dem Caryosom desselben, einen faserigen Kegel von diffusem Aussehen, der an seinem Ende ein stark gefärbtes Körperchen trägt. Dieses Strukturelement ist eine Centralspindel und das endständige Körperchen, von den die Geissel entspringt, ist das Basalkörperchen. Auch dies entspricht den Befunden von ROSENBUSCH, ist in unsern Falle aber noch deutlicher.

Bei dieser Form ist der Hauptkern eiförmig, mit regelmässiger dickerer Membran und einem grossen runden Caryosom im Zentrum. Die Kernsaftzone ist fast immer hell, ganz ohne Chromatin oder schliesst nur wenige und feine Bälkchen dieser Substanz ein. Die undulierende Membran, deren Breite etwas mehr als

lojia de protozoarios. Diversos dos nossos dezenhos registam este fato e num delles (Est. 13, fig. 1) observa-se, bem nitida a divizão do centriolo com formação do fuzo central (*Centralspindel*); as duas metades do nucleo são deziguais, o que não indica, como poderia parecer á primeira vista, divizão heteropolar, mas deve antes significar dezigualdade na evolução das duas partes do nucleo, como é de regra observar, segundo JOLLOS, no coccidio «*Adelea ovata*». Permanece, nesta figura, ainda intata a membrana nuclear, apezar de quazi completa a divizão das substancias do interior.

E' digno de salientar, na citolojia deste tripanozómida, a estrutura do blefaroplasto. Este se aprezenta com todas as partes e com a organização identica á do nucleo, com cariozoma, zona do suco nuclear, correspondendo ao halo claro que circumda este e membrana nuclear, de contorno nem sempre muito nitido. O modo de encarar o assunto pela escola de SCHAUDINN, por V. PROWAZEK, HARTMANN, etc., que consideram o blefaroplasto como segundo nucleo, o nucleo locomotor dos tripanozomidas, tem aqui solido apoio.

Morfolojia e ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi no organismo da cobaia.

Foi no organismo da cobaia que estudámos, principalmente, o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, sendo nossa descrição bazeada em grande numero de experiencias com aquelle animal. Das fazes principais do ciclo evolutivo, principalmente daquellas que constituem, na evolução deste tripanozómida, fenomeno não conhecido nas outras especies, procurámos e obtivemos confirmação no organismo do *Callithrix penicillata*, do cão e de outros animais sensiveis.

No sangue periferico das cobaias inoculadas e sistematicamente estudadas o *Schizotrypanum cruzi* tem primeira faze de evolução no interior das hemátias e outra livre no plasma, conforme acima dissemos. Já nas formas intraglobulares a dualidade morfolojica é bem acentuada, aprezentando-se uma das

einem Drittel der Breite des Plasmakörpers gleich kommt, zeigt eine geringe Zahl von Ausbuchtungen und lässt bei diesem Verfahren keine besondere Struktur erkennen. Die Geissel enspringt bei einigen Exemplaren von dem Basalkörperchen, das am Ende des Faserkegels liegt; manchmal ist jedoch weder die Centralspindel, noch das Basalkörperchen sichtbar und es entspringt dann die Geissel direkt der äusseren Membran des Blepharoplastkernes. Man kann annehmen, dass dann die Centralspindel rückgebildet und das Basalkorn infolge Schrumpfung unsichtbar geworden ist.

Das Plasma zeigt bei einigen Exemplaren eine sehr deutliche alveoläre Struktur, bei anderen jedoch einen undeutlichen diffusen, mehr oder weniger netzartigen Bau. Die Enden der Parasiten sind verschmälert und zugespitzt.

Die andere Form unterscheidet sich von der vorigen durch die viel geringere Grösse des Blepharoplasten und das Aussehen des Kernes. Hier zeigt der bald runde, bald eiförmige Blepharoplastkern ein kleineres Caryosom als in der vorigen Form, welches ebenfalls von einer helleren Zone umgeben ist, die in ihrer Peripherie einen Kreis von chromatischer Substanz in der Form einer Membran enthält. Vom Blepharoplastcaryosom entspringend, sieht man gewöhnlich die Centralspindel mit dem Basalkörperchen an einem Ende.

Der Kern ist rund, mit einem kleineren zentralen Caryosoma als in der vorigen Form, einer hellen Kernsaftzone ohne chromatische Substanz und dicker Membran. Bei dieser Form beobachtet man häufig einen sonderbaren Zustand des Kernes. Aehnliches wurde (nach mündlichen Mitteilungen von Dr. HARTMANN) von JOLLOS bei *Coccidien* und von ZÜLZER bei *Heliozoen* beobachtet (Fig. 1, 5, 6 u. 7, Taf. 13).

Die Kerne zeigen sich oft im Zustande der Mitose, ohne dass man an den anderen Teilen des Zellorganismus Teilungen erblicken könnte. Es handelt sich um eine frühzeitige Mitose des Kernes, welche einer Schizogonie des Parasiten vorangeht, eine heutzutage in der Cytologie der Protozoen bekannte Er-

formas, nos preparados tratados pelo GIEMSA, com grande blefaroplasto colocado na extremidade posterior e com nucleo muito longo, lonjitudinalmente disposto (Est. 10, fig. 11 e 12). A outra forma caracteriza-se pelo blefaroplasto menor, pelo aspeto do nucleo que, ao em vez de ser longo e estar lonjitudinalmente disposto, aprezenta-se ovoide, com a cromatina menos condensada, e, finalmente pela largura maior do plasma. Numa e noutra fórma o blefaroplasto, que, nos organismos completamente dezenvolvidos se acha quazi na extremidade posterior, póde ser visto afastado desta, mais para as proximidades do nucleo.

Em algumas fórmas intra-globulares não existem ainda o flajelo e a membrana ondulante, tambem auzentes, ás vezes, das formas prezas ás hemátias pelo blefaroplasto (Est. 10, fig. 17 e 18). Nestas ultimas, muito frequentes conforme dissemos, não é raro ver-se o nucleo localizado em porção dilatada do parazito, que se aprezenta com aspeto piriforme (Est. 10, fig. 16 e 17). E' frequente nas hemátias a que se acham prezos tripanozomidas ver-se a impressão deixada no globulo pelo parazito, parecendo nem sempre haver destruição do globulo vermelho parazitado. Não vimos, jamais, qualquer aspeto de pigmentação das hemátias em que se achavam tripanozomidas incluidos.

Abundantes no inicio da infeção, as fórmas intra-globulares do parazito são vistas em qualquer periodo, em maior ou menor quantidade, o que não admira, visto serem ellas faze necessaria na evolução deste flagelado.

Os tripanozomidas livres no plasma aprezentam morfolojia semelhante á das fórmas intra-globulares. E minuciozamente tratámos dessa morfolojia, quando descrevemos o parazito do sangue do sagui inoculado com sangue humano, pelo que, quazi nada nos resta dizer.

A dualidade de fórma continúa evidente. E, admitindo diferenciação sexuada relativa á diversidade morfolojica, deveremos considerar femea a fórma com blefaroplasto menor, quazi sempre esferico, com nucleo ovoide de cromatina frouxa, nas colorações pelo GIEMSA, scheinung. Verschiedene unserer Zeichnungen geben diesen Vorgang wieder und auf einer derselben (Fig. 1, Taf. 13) sieht man deutlich die Teilung des Centriols mit Bildung der Centralspindel (Centrodesmose); die beiden Hälften des Nucleus sind ungleich, was nicht, wie es auf den ersten Blick scheinen könnte, eine heteropolare Teilung beweist, sondern, wie das nach JOLLOS auch bei der Coccidie *Adelea ovata* in der Regel der Fall ist, eher eine Ungleichheit in der Entwicklung der beiden Teile des Kernes andeutet. Es bleibt in dieser Figur die Kernmembran noch unverändert, obgleich die Substanzen im Innern schon fast vollständig geteilt sind.

Bei der Cytologie dieses Trypanosomas verdient die Struktur des Blepharoplasten hervorgehoben zu werden. Derselbe zeigt sich in allen seinen Teilen und in seiner Organisation als identisch mit dem Nucleus, indem er ein Caryosom, eine Kernsaftzone (der das erstere umgebende, helle Hof) und eine Kernmembran mit — nicht immer sehr deutlichem — Umrisse besitzt. Hier findet die Anschauungsweise der SCHAUDINN'schen Schule (PROWAZEK, HARTMANN, u. s. w.), welche den Blepharoplasten als zweiten, lokomotorischen Kern der *Trypanosomen* ansieht, eine feste Stütze.

Morphologie und Entwicklungskreislauf des Schizotrypanum cruzi im Organismus der Meerschweinchen.

Den Entwicklungskreis des *Schizotrypanum cruzi* habe ich ganz besonders am Meerschweinchen studiert und meine Beschreibung beruht auf einer grossen Anzahl an diesen Tieren gemachter Versuche. Von den hauptsächlichsten Entwicklungsphasen dieses Trypanosomas, besonders denjenigen, welche noch unbekannte Vorgänge darstellen, suchte und fand ich die Bestätigung im Organismus der *Callithrix penicillata*, des Hundes und der anderen empfänglichen Tiere.

Im peripherischen Blute der geimpften und systematisch studierten Meerschweinchen hat das *Schizotrypanum cruzi* eine erste Entwicklungsphase im Innern der Blutkörperchen und eine zweite frei im Plasma, wie ich oben aus-

plasma mais largo. A outra fórma, de maior blefaroplasto, nucleo comprido e ovoide, plasma mais estreito, será, então, a fórma macha.

Não temos idéa formada, por emquanto, respeito á relação numerica entre essas duas fórmas no correr da infeção; certo é, porém, que em dados momentos ha predominancia evidente de uma sobre a outra.

Nas primeiras fazes de infeção observa-se no sangue periferico grande diversidade nas dimensões das fórmas de flajelados; encontram-se organismos, intra-globulares ou livres no plasma, muito estreitos e de pequeno comprimento, com nucleo longo, em faixa, ou arredondado, indicando assim, desde este estádio joven, a dualidade morfolojica (Est 10, fig. 22, 23 e 24). Nos preparados, segundo ROSENBUSCH, encontrámos minucias de estrutura que merecem especial referencia. Os flajelados do plasma aprezentam blefaroplasto com a estrutura nuclear já descrita a propozito do tripanozomida humano no sangue; identica, tambem, é a estrutura do nucleo, havendo ainda figuras muito tipicas de mitoze precoce. O aspeto do plasma, da membrana ondulante e do flajelo é identico aos descritos para o tripanozomida, no macaco. O que observámos aqui de interessante foi a prezença frequente de estrutura fibrilar especial, constituida de unica fibrila espessa (Centrodesmoze), ligando o nucleo ao blefaroplasto (Est. 13, fig. 5, 6 e 8). Parece tratar-se do fuzo central da divizão heteropolar, o qual teria permanecido, apoz as formações do blefaroplasto.

Esquizogonia do Schizotrypanum cruzi no pulmão de vertebrado.

As mais minuciozas pesquizas nunca nos permitiram verificar qualquer aspeto que pudesse ser considerado como divizão lonjitudinal do *Schizotrypanum cruzi* no sangue periferico, ou nos orgãos profundos. Este fato, de si, indicava a existencia de outro processo de multiplicação, que pesquizámos e verificámos amplamente, constando elle de esquizogonia do flagelado no pulmão dos animais infetados. Não temos ainda determinandergesetzt habe. Schon bei den intraglobulären Formen ist die morphologische Dualität gut gekennzeichnet, indem eine der Formen in Präparaten, die nach GIEMSA gemacht sind, einen grossen, am Hinterende liegenden, Blepharoplasten und einen sehr langen, längsgerichteten Kern zeigt (Fig. 11, 12, Taf. 10). Die andere Form charakterisiert sich durch kleineren Blepharoplasten und die Form des Kernes, welcher, statt lang und längsgerichtet, eiförmig und mit weniger dichtem Chromatin versehen erscheint, endlich durch die grössere Breite des Plasmakörpers. In beiden Formen kann der Blepharoplast, der in ganz entwickelten Organismen sich beinahe am Hinterende findet, von diesem entfernt und mehr in der Nähe des Kernes gesehen werden.

Bei einigen der intraglobulären Formen fehlt die Geissel und die undulierende Membran, welche auch zuweilen bei den Formen, die mittelst des Blepharoplasten an den Blutkörperchen haften, vermisst werden (Fig. 17 und 18, Taf. 10). Bei letzteren, die, wie gesagt, sehr häufig sind, sieht man öfters den Kern in einer erweiterten Portion der birnförmig erscheinenden Parasiten liegen (Fig. 16 und 17, Taf. 10). Nicht selten erkennt man in den Blutkörperchen, denen Trypanosomiden anhaften, den vom Parasiten zurückgelassenen Eindruck, wobei dasselbe nicht immer zerstört zu werden scheint. Niemals habe ich bei den eingeschlossenen Trypanosomiden irgend eine Andeutung von Blutpigment gesehen.

Die zu Anfang der Infektion häufigen, intraglobulären Parasitenformen werden zu jeder Zeit in grösserer oder geringerer Menge beobachtet, was nicht verwundern kann, da sie eine notwendige Entwicklungsphase dieses Flagellaten darstellen; die im Plasma frei vorkommenden Trypanosomiden zeigen eine Morphologie, welche derjenigen der intraglobulären Formen ähnlich ist. Dieselbe ist eingehend behandelt worden, als ich den Parasiten der mit menschlichem Blut geimpften Pinseläffchen beschrieb, weshalb nichts mehr darüber gesagt zu werden braucht. Die Dualität der Formen bleibt auch weiterhin deutlich. Wenn man entsprechend der verschiedenen Morphologie einen Geschlechtsunterschied an-

minismo seguro para surpreender a faze de esquizogonia do parazito, com facilidade. E' que a virulencia do *Schizotrypanum cruzi* parece variar de acordo com diversos fatores, ainda não determinados, parecendo delles o mais importante a passajem atravez do organismo da mesma especie animal. Assim é que, em nossas experiencias, a inoculação de 1 centimetro cubico de sangue de cobaias infetadas por conorrinos, matava, quazi seguramente, os animais, em 5 dias, aprezentando as cobaias grande abundancia de fórmas esquizogonicas no pulmão e alguns flajelados no sangue periferico. Apoz algumas passajens em cobaias, porém, o tripanozómida não matava mais os animais naquelle espaço de tempo, vindo as cobaias a morrer apoz 1 ou 2 mezes, geralmente com intensa infeção e sendo encontradas, no pulmão, grande abundancia de fórmas esquizogonicas. Por outro lado, em qualquer faze da molestia encontram-se poucas fórmas de multiplicação, sendo as vezes dificil verificar, nestas condições, a esquizogonia.

De multiplas experiencias concluimos ser o melhor processo, para obter abundancia de fórmas esquizogonicas, a inoculação intraperitoneal de 1 a 2 centimetros cubicos de sangue de cobaia infetada por conorrinos, sacrificando-se os animais, quando não morram, do 5.º ao 6.º dia depois da inoculação.

A abundancia de fórmas de esquizogonia no momento da morte dos animais com infeção demorada (cronica) e o menor numero dellas em outras fazes da molestia, nos animais sacrifacados, faz-nos acreditar em multiplicações periodicas do parazito, que seriam verdadeiras recrudecencias da molestia; tanto mais quanto, no sangue periferico, a quantidade de flajelados aprezenta ocilações, cujas normas não nos foi possivel ainda determinar.

No pulmão, a esquizogonia, como a do parazito da malaria, realiza-se nos capilares, multiplicando-se o tripanozómida do seguinte modo: Os parazitos perdem o flajelo e a membrana ondulante, deslocando-se o nucleo de sua pozição normal para o lado da extremidade anterior; esta extremidade, por movimento de flexão do organismo, aproxima-se

nimmt, müssen wir die Formen mit kleinerem, gewöhnlich rundem Blepharoplasten, mit eiförmigem, lockeres Chromatin enthaltendem Kerne und breiterem Plasmakörper (bei GIEMSA-färbung) als weibliche ansehen. Die andere Form mit grösserem Blepharoplasten, eiförmigem oder langgestrecktem Kerne und schmälerem Plasmakörper, wäre dann die männliche.

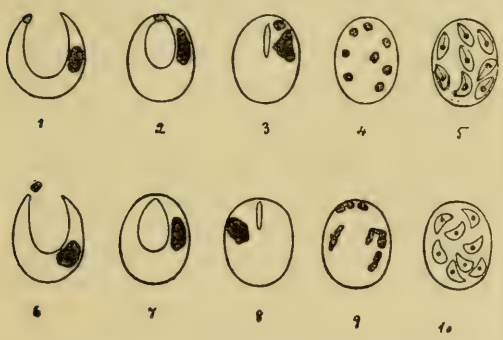
Ich habe zur Zeit noch kein sicheres Urteil über das Zahlenverhältnis, welches zwischen beiden Formen in Verlauf der Infektion besteht; jedoch steht soviel fest, das zu gewissen Zeiten die eine über die andere in auffallender Weise vorwiegt.

In den ersten Infektionsphasen beobachtet man im peripherischen Blute eine grosse Verschiedenheit in den Dimensionen der Flagellatenformen; man findet intraglobuläre und frei im Plasma vorkommende Organismen, die sehr schmal und kurz sind und einen breiten Kern haben, der bandförmig oder rund ist und die auf diese Weise schon im Jugendzustande die morphologische Dualität verraten. (Fig. 22, 23 und 24, Taf. 10). In den Präparaten nach ROSENBUSCH fand ich Struktureinzelheiten, welche eine besondere Erwähnung verdienen. Die Flagellaten im Plasma zeigen einen Blepharoplasten mit der — schon bei dem, vom Menschen abstammenden, Trypanosomiden des Pinseläffchens beschriebenen — Struktur; auch der Bau des Kernes ist identisch, indem gleichfalls typische Bilder von frühzeitiger Mitose vorkommen. Plasma, undulierende Membran und Geissel gleichen vollständig den bei den Parasiten des Aeffchens beschriebenen Bildern. Besonders interessant war auch eine, häufig beobachtete, fibrilläre Struktur, welche aus einer einzigen dicken, Kern und Blepharoplast verbindenden, Fibrille (Centrodesmose) besteht. (Fig. 5, 6, 8, Taf. 13). Es scheint sich um den Rest der Kernspindel der heteropolaren Teilung zu handeln, welche nach der Bildung des Blepharoplasten weiter besteht.

Schizogonie des Schizotrypanum cruzi in der Lunge der Wirbeltiere.

Die eingehendsten Beobachtungen gestatteten mir niemals, im peripherischen Blute

da posterior com ella se fundindo; torna-se, então, esferico ou arredondado o parazito, e, é possivel ver ainda, em muitos exemplares, a fenda de separação entre as duas metades do organismo que se uniram lateralmente. O blefaroplasto tem, no fenomeno, duplo procedimento: Ora elle se separa do parazito, juntamente com o flajelo, antes que o tripanozómida se tenha tornado esferico, (Est. 10, fig. 31 a 36 e fig. do texto de 6 a 10) ora elle é conservado, funde-se com o nucleo e entra com elle em multiplicação. (Fig. do texto 1 a 5). Esta duplicidade de processo, em relação ao blefaroplasto, vem aliaz confirmada no aspeto das fórmas esquizogonicas completamente divididas. (Vide fig. 5 a 10 do texto).



Segue-se a divizão do nucleo; delle só, num dos casos; do nucleo e do blefaroplasto, no outro. O processo de divizão nuclear, os fenomenos celulares exatos deste momento do ciclo são ainda obscuros, porquanto não os estudámos, o que devemos fazer depois, com o emprego da fixação a humido e no estado vivo.

As fórmas segmentadas aprezentam 8 pequenos organismos claviformes, dispostos irregularmente no interior do espaço limitado por delgada pelicula que será, de certo, o periplasto do parazito. Esta pelicula, a um exame superficial, poderia impropriamente, fazer considerar as fórmas descritas como quistos, impressão fornecida, ainda, nos preparados fixados apoz dessecamento, por orla clara, de duplo contorno, que cerca o parazito nesta faze e que deverá ser explicada pela coagulação de substancias aderentes á

oder in den inneren Organen irgend ein Bild aufzufinden, welches als eine Längsteilung des Schizotrypanum angesehen werden könnte. Dies allein genügt, um die Existenz eines anderen Vermehrungsprozesses nahe zu legen; ich suchte einen solchen und fand ihn sehr reichlich: er besteht in einer Schizogonie des Trypanosomas in der Lunge der infizierten Tiere. Es fehlt noch an einem sicheren Anhaltspunkte, um die Schizogoniephase des Parasiten mit Leichtigkeit auffinden zu können. Der Grund liegt darin, dass die Virulenz des *Schizotrypanum cruzi* unter dem Einfluss verschiedener noch unbekannter Faktoren wechseln kann, wobei als der wichtigste die Passage durch den Organismus derselben Tierart erscheint. So tötete in unseren Versuchen die Einspritzung eines ccm. Blutes von Meerschweinchen, welche durch *Conorhinus* infiziert waren, die Tiere fast sicher in 5 Tagen, wobei die Meerschweinchen eine grosse Menge von Schizogonieformen in der Lunge und einige Flagellaten im peripherischen Blute zeigten. Nach einigen Meerschweinchenpassagen tötete aber das *Schizotrypanum* die Tiere nicht mehr in dieser Zeit, indem die Meerschweinchen ein bis zwei Monate später starben, gewöhnlich mit intensiver Infektion, wobei man in der Lunge eine grosse Menge von Schizogonieformen fand. Auf der anderen Seite finden sich in einer beliebigen Krankheitsphase nur wenige Vermehrungsformen, sodass es unter solchen Bedingungen schwer hält, die Schizogonie zu beobachten.

Aus zahlreichen Versuchen schliesse ich, dass die beste Methode, reichliche Schizogonieformen zu erhalten, in der Intraperitonealeinspritzung von 1 bis 2 ccm. Blut von Meerschweinchen, die durch *Conorhinus* infiziert wurden, besteht, wobei man die Tiere, wenn sie nicht sterben, am 5. oder 6. Tage nach der Einspritzung tötet.

Der Reichtum an Schizogonieformen bei Tieren mit chronischer Infektion im Momente des Todes und die geringere Zahl desselben bei — in anderen Phasen der Krankheit — getöteten — Tieren lässt mich an eine periodische Vermehrung des Parasiten glauben, wodurch eigentliche Rückfälle der Krankheit zu Stande

superficie da celula. Aliaz, aspeto identico é observado nas amebas em repouzo, especialmente nas culturas em agar, quer no estado vivo, quer no material fixado.

Aprezentam-se com dois aspetos, em relação á estrutura dos merozoitos, as fórmas segmentadas do parazito, bem estudadas nos preparados fixados pelo metodo de SCHAUDINN e córados pelo de ROSENBUSCH. Verificámos, assim, duas estruturas bem distintas: óra, os merozoitos se aprezentam com nucleo esferico, tendo pequeno cariozoma central e zona de suco nuclear distinta limitada por delgada membrana, (Est. 13, Fig. 26) não sendo encontrado nestes o blefaroplasto; óra se aprezentam com nucleo, possuindo maior quantidade de cromatina, tendo cariozoma maior que o das fórmas anteriores, esferico e unico, ou disposto em 2 lóbos; nestes vê-se quazi sempre o blefaroplasto, colocado na extremidade delgada do parazito e ligado ao nucleo por filamento cromatico (Est. 13, Fig. 25, 27 e 28) ou situado muito proximo do nucleo, delle apenas diferenciado. Na mesma fórma segmentada encontram-se, ás vezes, diversos estádios dos merozoitos em relação á pozição do blefaroplasto, conforme é facil verificar á fig. 27, Est. 13. Os merozoitos da primeira estrutura, que consideramos como fórmas femeas, são tambem menores que os outros, que acreditamos ser os elementos machos. E' bem de crer que as fórmas segmentadas, cujas unidades se aprezentam já com o blefaroplasto, individualizado, correspondam aos tripanozómidas que conservaram o blefaroplasto, e as outras sejam a esquizogonia dos flajelados cujo blefaroplasto fôra expelido com o flajelo, no momento de se tornarem esfericos, no pulmão. Nos preparados córados pelo GIEMSA é possivel verificar alguns pontos da estrutura descrita, especialmente a prezença ou auzencia do blefaroplasto. (Est. 11, Fig. 42, 43, 44 e 46). Alí, porém, o nucleo se aprezenta sem estrutura apreciavel, como massa de cromatina compacta, geralmente disposta em 2 lóbos. (Est. 11, Fig. 45).

Os merozoitos, parece, escapam individualmente do espaço limitado pela pelicula envolvente; não ha aqui, como para o cazo do

kommen, um so mehr, als im peripherischen Blute die Zahl der Flagellaten Schwankungen zeigt, deren Gesetz ich noch nicht feststellen konnte.

In der Lunge vollzieht sich die Schizogonie, wie bei Malariaparasiten, in den Kapillaren, indem das Trypanosoma sich auf folgende Weise vermehrt: die Parasiten verlieren Geissel und undulierende Membran, während der Kern sich aus seiner normalen Stellung nach dem Vorderende zu disloziert; dieses Ende nähert sich durch eine Biegung des Organismus dem Hinterende und verschmilzt mit demselben; der Parasit wird so rundlich oder kugelförmig und man kann bei manchen Exemplaren noch die Trennungsspalte zwischen den beiden Hälften der Organismen, die sich seitlich vereinigt haben, wahrnehmen. Der Blepharoplast zeigt bei dieser Erscheinung ein zweifaches Verhalten: bald trennt er sich von dem Parasiten, zugleich mit der Geissel, bevor sich das Trypanosoma abrundet; bald bleibt er erhalten und vereinigt sich mit dem Kern, mit dem zusammen er die Vermehrung eingeht. Diese Duplizität des Prozesses in Hinsicht auf das Verhalten des Blepharoplastes wird durch das Aussehen der bereits völlig geteilten Schizogonieformen weiter bestätigt.

Es folgt hierauf die Teilung, in einem Falle des Kernes allein, im anderen des Kernes und Blepharoplasten. Der Prozess der Kernteilung und die genaueren Vorgänge in der Zelle während dieser Phase sind noch unklar, da ich sie nicht, wie ich später zu thun gedenke, unter Anwendung der feuchten Fixierung oder im lebenden Zustande studiert habe.

Die Teilungsformen zeigen 8 kleine, keulenförmige Teilungsprodukte, die unregelmässig im Innern eines, von dünner Haut begrenzten, Raumes angeordnet sind; letzerer muss dem Periplast des Parasiten entprechen und könnte bei oberflächlicher Untersuchung die beschriebenen Formen unrichtigerweise als Cysten auffassen lassen. Dieser Eindruck wird in den nach dem Trocknen fixierten Präparaten auch durch einen hellen Saum mit doppeltem Kontur, welcher den Parasiten in diesem Zustande umgiebt, hervorgerufen;

parazito da malaria, rutura total da fórma segmentada. E' o que se deduz de nossos dezenhos onde são vistos organismos atravessando a pelicula, ainda intata, e outros já no exterior, aderentes á superficie externa.

São estes os pequenos organismos, rezultantes da esquizogonia do tripanozómida no pulmão, que penetram nos glóbulos vermelhos e evolvem, chegando ao estádio de flajelados. As fórmas jovens intra-globulares aprezentam morfolojia identica á descrita nos merozoitos do pulmão; vêm-se organismos com o blefaroplasto já individualizado (Est. 10, Fig. 1) e outros sem blefaroplasto (Est. 10, Fig. 2 e 3); este se acha misturado ao nucleo. A formação do blefaroplasto nas fórmas intra-globulares da ultima categoria dá-se por divizão heteropolar do nucleo, conforme indica nosso dezenho. Aí se vê o blefaroplasto, já diferenciado, ligado ainda ao nucleo pelo fuzo central da divizão heteropolar. Devemos referir aqui a necessidade de preparados muito bem sucedidos para o estudo das fórmas jovens intra-globulares, as quais, por outro lado, só se encontram, em grande abundancia, em certas fazes da infeção, especialmente na faze inicial.

Evolução do Schizotrypanum cruzi no organismo do inséto transmissor.

A maioria de nossas experiencias sobre a evolução do *Schizotrypanum cruzi,* no organismo do *Conorhinus,* tem sido realizadas em larvas novas do hemiptero, nacidas no laboratorio. Os insétos adultos e as ninfas, quando colhidos em rezidencias de individuos na condição morbida referida, aprezentam, quazi em totalidade, flajelados no intestino médio e no reto, pelo que não constituem material de escolha para observações sistematicas sobre o ciclo exojeno do parazito.

Da condição infecioza de larvas, quando mantidas em suas sédes naturais, não temos conhecimento, por emquanto; aquellas, porém, nacidas no laboratorio, embóra de ovos postos por insétos que aprezentam flajelados no intestino, não se mostram infetadas. E, para a verificação necessaria da hipoteze de que os

doch ist derselbe aus der Gerinnung der Zellenoberfläche anhängender Substanzen zu erklären. Uebrigens beobachtet man ein gleiches Bild bei den ruhenden Amöben, besonders in Agarkulturen, an lebendem sowohl, wie an fixiertem Material.

Die segmentierten Formen des Parasiten zeigen in Hinsicht auf die Struktur der Merozoiten eine doppelte Form, welche — in nach SCHAUDINN fixierten und nach ROSENBUSCH gefärbten Präparaten — gut studiert wurden. Auf diese Weise fand ich zwei deutlich verschiedene Strukturen: einmal zeigen die Merozoiten einen runden Kern, welcher ein kleines Caryosom und eine deutliche, von dünner Membran begränzte, Kernsaftzone aufweist (Taf. 13, Fig. 26), wobei kein Blepharoplast gefunden wird; im anderen Falle haben sie einen Kern mit grösserer Chromatinmenge und einen Caryosom, welches grösser als bei den vorigen Formen, einheitlich oder aus zwei Lappen gebildet ist; hier sieht man fast immer den Blepharoplasten am dünnen Ende des Parasiten liegend und mit dem Kerne durch ein Chromatinfilament verbunden (Tafel 13, Fig. 25, 27 und 28) oder auch nahe am Kerne gelegen und kaum von demselben differenziert. In derselben Teilungsform findet man zuweilen, in Hinsicht auf die Lage der Blepharoplasten, verschiedene Formen der Merozoiten, wie man leicht in der Fig. 27, Taf. 13 erkennen kann. Die Merozoiten der zuerst beschriebenen Struktur, welche wir als weibliche Form auffassen, sind ausserdem kleiner als die anderen, die wir für männliche Elemente halten. Es ist auch anzunehmen, dass die Teilungsformen, deren Teilstücke sich im Blepharoplasten schon individualisiert zeigen, denjenigen Trypanosomen entsprechen, welche den Blepharoplasten beibehalten haben, während die anderen die Schizogonie des Flagellaten darstellen, welche — bei der Abrundung in der Lunge — den Blepharoplasten mit der Geissel abgestossen haben. Bei, nach GIEMSA gefärbten, Präparaten kann man einige Einzelheiten der beschriebenen Strukturen erkennen, besonders die Gegenwart oder das Fehlen des Blepharoplasten (Taf. 11, Fig. 42, 43, 44 und 46). Doch zeigt sich hier der Kern ohne erkennbare Struktur, als

flajelados das larvas em experiencia fossem parazitos naturais dellas, transmitidos por herança e cultivados no sangue injerido, procedemos, em muitas de nossas pesquizas, de modo a izentar os rezultados daquella cauza alegavel de erro. Assim é que dividiamos a coleção de larvas, nacidas dos ovos de determinada postura, em duas partes, alimentando uma dellas em animal infetado e a outra em animais indenes. A auzencia, multiplas vezes verificada, de flajelados no tubo dijestivo das larvas nutridas em animais normais, com a prezença simultanea de parazitos nas outras, elimina, de uma vez, a objeção possivel de infeção hereditaria do inséto e de cultura, nelle, de fórmas parazitarias preexistentes.

Algumas das fazes do ciclo evolutivo do flajelado foram verificadas em insétos adultos, nos quais, aliaz, repetimos muitas vezes as observações feitas nas larvas. Nas ninfas as pesquizas encontram maior dificuldade, porque nellas o sangue, na porção quilifica do intestino médio, sofre modificações rapidas, transformando-se desde o 3.º ao 4.º dia apoz a injestão, em massa extremamente compata e dura, na qual a fixação e coloração do parazito tornam-se quazi impossiveis.

O tubo dijestivo das larvas de *Conorhinus*, de 15 a 20 horas, apoz a primeira injestão de sangue, aprezenta, em relação ao conteúdo, duplo aspeto: Na porção quilifica do intestino médio, que se mostra dilatada ao extremo, ovoide, encontra-se sangue vermelho, em via de dijestão; na porção cilindrica, estreita, encontra-se liquido negro, granulozo, que reprezenta o rezultado da dijestão do sangue. Depois de 30 horas aparece no conteúdo liquido amarelado. A permanencia de sangue no intestino quilifico é longa, sendo elle aí encontrado até o 5.º dia depois da injestão.

Nos insétos adultos, recentemente alimentados, o aspeto do tubo dijestivo é identico, com pequenas variantes, ao das larvas; naquelles, porém, deixados em jejum desde alguns dias, 8 pelo menos, a porção quilifica não aprezenta sangue, contendo só um liquido incolor espumozo.

eine kompakte, gewöhnlich zweilappige Chromatinmasse (Taf. 11, Fig. 45).

Wie es scheint, schlüpfen die Merozoiten einzeln aus dem von der umgebenden Membran begrenzten Raume aus, indem es hier nicht, wie im Falle der Malariaparasiten, zu einem gänzlichen Zerfall der Teilungsform kommt. Dies kann man aus unseren Zeichnungen ersehen, wo man Organismen erkennt, welche die noch erhaltene Membran durchsetzen und andere schon freiliegende, welche der äusseren Fläche anhaften.

Diese kleinen aus der Schizogonie in der Lunge hervorgehenden Organismen sind es, welche in die roten Blutkörperchen eindringen und sich zur Phase von Flagellaten entwickeln. Die jungen endoglobulären Formen zeigen eine identische Morphologie, wie die beschriebenen Merozoiten der Lunge, indem man Organismen mit schon individualisierten Blepharoplasten sieht, wobei derselbe noch mit dem Kern vereinigt ist (Tafel 10, Fig. 1), neben anderen ohne solchen (Taf. 10, Fig. 2 und 3).

Die Bildung des Blepharoplasten in der letzten Art von intraglobulären Formen erfolgt durch heteropolare Kernteilung, wie unsere Zeichnung zeigt. Hier sieht man den Blepharoplasten schon differenziert, aber noch mit dem Kerne durch die Centralspindel der heteropolaren Teilung verbunden. Ich muss hier die Notwendigkeit gut gelungener Präparate für das Studium der jungen intraglobulären Formen betonen; letztere finden sich überdies nur in gewissen Phasen, besonders zu Beginn der Infektion, in grosser Menge.

Entwicklung des «Schizotrypanum cruzi» im Organismus des Ueberträgers.

Die Mehrzahl meiner Versuche über die Entwicklung des *Schizotrypanum cruzi* im Organismus des *Conorhinus* stellte ich an jungen Larven dieser Wanze an, welche im Laboratorium ausgeschlüpft waren. Erwachsene Insekten und Nymphen, welche in den Wohnungen von Patienten mit den bereits geschilderten Krankheitserscheinungen gesammelt wurden, zeigten fast durchwegs Flagellaten im Mittel- und Enddarm, weshalb sie

Nas ninfas, desde o 5.º dia, o sangue, na porção quilifica do tubo dijestivo, transforma-se em massa compata, onde as pesquizas são dificeis.

As larvas só aceitam refeição 4 ou 5 dias apoz a eclozão. D'aí em diante, embóra com permanencia de sangue no intestino quilifico, sugam facilmente de 3 em 3 dias, repletando-se a cada refeição, ficando então com o abdome muito aumentado, de fórma ovoide.

De numerozas experiencias, realizadas sobre a evolução do *Schizotrypanum cruzi* no organismo do *Conorhinus*, temos colhido rezultados do mais alto interesse, quer para a biolojia particular daquelle flajelado, quer para o ponto de vista geral, para as questões de doutrina relativas ao mecanismo da transmissão dos hemoflajelados pelos invertebrados. Existem ainda, é certo, nesta parte de nosso trabalho, alguns pontos importantes não esclarecidos e cuja solução nos preocupa atualmente; do que ha feito, porém, será talvez possivel tirar ilações aproveitaveis ás pesquizas similares, achando-se, em nossos rezultados, esclarecidos muitos fenomenos, até aqui obscuros, do papel dos hospedeiros intermediarios nas tripanozomiazes.

Exporemos primeiro, simplesmente, nossas observações, estudando as transformações morfolojicas do parazito nas diversas fazes do ciclo; em considerações finais procuraremos então interpretar os fatos adquiridos, concluindo de acordo com as experiencias realizadas.

Decorridas 6 horas apoz a injestão, pelo *Conorhinus*, de sangue contaminado, têm lugar as primeiras modificações evolutivas do parazito.

O blefaroplasto, que nos organismos normais se acha muito proximo ou exatamente na extremidade posterior da celula, caminha dalí para as proximidades do nucleo, pondo-se em contato intimo com elle (Est. 11, Fig. 47 a 55). Si ha fuzão do blefaroplasto com o nucleo principal, não o sabemos com segurança, sendo, porém, provavel que isso aconteça, porquanto, em muitas fórmas, neste momento o blefaroplasto é visto no interior do nucleo, constituindo aí um corpusculo mais intensamente córado.

kein geeignetes Material für systematische Beobachtungen über den exogenen Entwicklungszyklus des Parasiten bilden.

Ueber die Infektiosität von Larven an ihrem natürlichen Fundort habe ich zur Zeit keine Erfahrung; jedoch zeigten sich die im Laboratorium gezüchteten nicht infiziert, obwohl die Eier von Exemplaren stammten, welche Flagellaten im Darme zeigten.

Es erschien notwendig, die Hypothese zu prüfen, dass die Flagellaten der beim Versuche gebrauchten Larven natürliche Parasiten derselben seien, die erblich übertragen werden und sich nach der Blutaufnahme vermehren; ich ging daher bei vielen meiner Untersuchungen so vor, dass ich die Möglichkeit dieser Fehlerquelle ausschloss. Ich teilte deshalb die, aus gleichzeitig abgelegten Eiern, ausgeschlüpften Larven in zwei Gruppen, von denen eine an einem infizierten Tiere, die andere an gesunden Tieren ernährt wurde. Die vielfach festgestellte Abwesenheit der Flagellaten im Darme der mit dem Blute normaler Tiere ernährten Larven und das gleichzeitige Vorkommen der Parasiten bei den andern schliesst vollständig den Einwand aus, dass eine hereditäre Infektion des Insektes und eine in demselben erfolgte Vermehrung präexistierter Parasiten vorliege.

Einige Phasen des Entwicklungszyklus der Flagellaten wurden bei erwachsenen Insekten festgestellt, bei welchen wir übrigens die an den Larven gemachten Beobachtungen oftmals wiederholten. Bei den Nymphen stossen die Untersuchungen auf grössere Schwierigkeiten, da bei denselben das Blut in dem chylusbildenden Teile des Mitteldarmes sich rasch verändert und vom dritten oder vierten Tage an eine äusserst kompakte und harte Masse darstellt, welche die Fixierung und Färbung des Parasiten fast unmöglich macht.

Der Darmkanal der *Conorhinuslarven* zeigt 15—20 Stunden nach der ersten Blutaufnahme eine zweifache Beschaffenheit seines Inhalts: Im chylusbildenden Teile des Mitteldarmes, welcher extrem erweitert und eiförmig erscheint, findet man rotes Blut im Stadium der beginnenden Verdauung; im engeren cylindrischen Teile ist eine schwarze körnige Flüssig-

Nesta primeira faze a maioria das fórmas já se aprezenta sem flajelo e sem membrana ondulante, o que faz acreditar seja a perda destas duas estruturas o fenomeno inicial da evolução; alguns organismos, porém, com o blefaroplasto muito proximo do nucleo, possuem ainda flajelo, cuja porção livre tem, então, maior comprimento que nos parazitos normais. Os organismos, assim modificados, tornam-se depois redondos (Est. 11, Fig. 58) e entram em multiplicação, ás vezes muita rapida, vendo-se grandes aglomerações de fórmas esfericas. Cumpre salientar que estas fórmas aparecem frequentemente sem blefaroplasto e que tambem se encontram figuras que denunciam nova formação do blefaroplasto achando-se elle ainda ligado ao nucleo principal pelo filamento central da divizão hetero-polar, e, finalmente, fórmas ha sem esta ligação entre os dois nucleos.

Estas fórmas são a principio aflajeladas e, nos preparados fixados humidos e córados pelo ROSENBUSCH, mostram a estrutura seguinte:

O plasma é alveolar, de colorido uniforme e aprezenta, na superficie, delgada camada mais condensada, que é o periplasto. O nucleo, de fórma esferica, colocado no centro da celula, mostra um grande cariozoma, em cujo centro, nos preparados mais diferenciados, é possivel, ás vezes nitidamente, verificar a prezença do centriolo (Est. 13, Fig. 9).

Em torno do cariozoma existe largo espaço claro, a zona de suco nuclear, atravessada, no sentido transversal, por finas trabeculas de linina, limitada por membrana de contornos muito regulares. Esta membrana, óra se aprezenta com aspeto homojeneo, óra mostra pequenos granulos de cromatina mais intensamente córados (Est. 13, Fig. 13) regularmente dispostos e equidistantes. A estes granulos prendem-se os filamentos de linina partidos do cariozoma.

O nucleo, assim descrito para a generalidade das fórmas observadas, aprezenta algumas variantes, relativas, sobretudo, á quantidade da substancia cromatica contida na zona do suco nuclear, onde, ás vezes, a cromatina

keit enthalten, welche das Endresultat der Blutverdauung darstellt. Nach 30 Stunden erscheinen im Rektum die Exkremente in Form einer gelblichen Flüssigkeit. Das Blut verweilt im Chylusdarm eine lange Zeit und wird daselbst noch 5 Tage nach der Aufnahme gefunden.

Bei erwachsenen, frisch gefütterten Insekten gleicht der Darmkanal demjenigen der Larven bis auf geringe Unterschiede; dagegen zeigen sie nach längerem, wenigstens 8-tägigem, Fasten im Chylusdarme nicht Blut, sondern eine farblose schaumige Flüssigkeit.

Bei den Nymphen verändert sich das Blut im Chylusdarme, wie gesagt, vom 5. Tage an in eine kompakte Masse.

Die Larven nehmen die Nahrung erst 5 bis 6 Tage nach dem Ausschlüpfen an. Von da an und trotz des Fortbestehens vom Blut im Chylusdarme, saugen sie ohne Umstände von 3 zu 3 Tagen, indem sie ihn jedes mal vollständig anfüllen, sodass der Hinterleib sehr vergrössert und eiförmig erscheint.

Aus den vielfachen Versuchen über die Entwicklung des *Schizotrypanum cruzi* in *Conorhinus* gewann ich höchst interessante Resultate, sowohl in Hinsicht auf die specielle Biologie dieser Flagellaten, als auch in Beziehung auf die allgemeine Lehre über den Vorgang der Uebertragung der Hämoflagellaten durch blutsaugende Schmarotzer. Allerdings gibt es in diesem Teile meiner Untersuchung einige Punkte, die noch unaufgeklärt sind und mich gegenwärtig beschäftigen; doch kann man wohl aus dem bereits Festgestellten Schlüsse ziehen, welche für ähnliche Untersuchungen von Nutzen sind, da sich hier die Erklärung vieler bisher dunkler Erscheinungen in Beziehung auf die Rolle des Zwischenwirtes bei Trypanosomenerkrankungen findet.

Ich gebe zuerst nur meine Beobachtungen wieder, aus welchen die morphologischen Veränderungen des Parasiten in den verschiedenen Entwicklungsstadien ersichtlich sind; hierauf werde ich die Tatsachen zu erklären und aus den zahlreichen Experimenten endgiltige Schlüsse zu ziehen suchen.

Sechs Stunden nach der Aufnahme des parasitenhaltigen Blutes durch den *Conorhinus* gehen die ersten Veränderungen des Para-

é mais abundante, constituindo, em algumas fórmas, fina rêde na superficie interna da membrana nuclear. São variações que, na teoria de HARTMANN, devem ser atribuidas ás modificações ciclicas do cariozoma (lançamento de cromatina na zona de suco nuclear) e que são comparaveis a fenomenos similares observaveis na *Amoeba tetragena.*

O blefaroplasto aprezenta aqui aspeto comparavel ao descrito nos flajelados do sangue. Nelle existe um grande cariozoma, quazi sempre constituido por espessa barra de substancia cromatica, (Est. 13, Fig. 9 e 11) curva, aprezentando concavidade voltada, — nas fórmas jovens aflajeladas — para o lado do nucleo. Cérca o cariozoma do blefaroplasto zona clara, na qual não são viziveis filamentos cromaticos; é a zona do suco nucleo-blefaroplastico limitada por delgada membrana de contornos pouco regulares.

A pozição do blefaroplasto é, como já dissémos, variavel, achando-se, óra colocado no interior do nucleo, em qualquer ponto da zona do suco nuclear, óra aderente á superficie externa da membrana delle, óra, finalmente, distante do nucleo, a este ligado, ás vezes, pelo filamento central da divizão hetero-polar.

Nos preparados córados pelo GIEMSA, nesta como nas fazes seguintes da evolução exojena do flajelado, encontram-se granulações córadas em vermelho intenso, de dimensões variaveis. São identicas ás descritas por ROSENBUSCH nas culturas de hemoproteo e parecem ser granulações de volutina (SWELLENGREBEL).

A formação do aparelho flajelar inicia-se, muitas vezes, nestas fórmas esfericas, encontrando-se então, (Est. 13, Fig. 9, 11 e 12) como rezultado da divizão heteropolar do blefaroplasto, um cone de fibrilas, o *fuzo central com o rizoplasto do centro,* que aprezenta no apice um granulo de substancia cromatica, o *corpusculo bazal,* orijem do flajelo. Algumas vezes, nas fórmas esfericas, o flajelo só tem porção intra-celular, não existindo ainda, aí, flajelo livre; em alguns organismos, porém, já se encontra flajelo livre, que, frequentemente atinje grande comprimento.

siten vor sich. Der Blepharoplast, welcher beim normalen Organismus sich sehr nahe oder ganz am Hinterende der Zelle befindet, wandert von dort in die Nähe des Nucleus und tritt mit demselben in innige Berührung. (Taf. 11, Fig. 47 und 55). Ob eine Verschmelzung des Blepharoplasten mit dem Hauptkerne stattfindet, weiss ich zwar nicht gewiss, doch ist es wahrscheinlich, da man bei vielen Formen zu dieser Zeit den Geisselkern im Innern des Nucleus sieht und zwar in Gestalt eines stärker gefärbten Körnchens.

In diesem ersten Stadium zeigt sich die Mehrzahl der Formen bereits ohne Geissel und undulierende Membran, sodass man den Verlust dieser beiden Strukturen als die erste Erscheinung der Entwicklung auffassen kann; doch besitzen einige Formen, deren Blepharoplast dem Kerne sehr genähert ist, noch eine Geissel, deren freier Teil dann länger erscheint, als bei der normalen Parasitenform. Nach dieser Veränderung rundet sich der Organismus ab (Taf. 11, Fig. 58) und vermehrt sich, oft sehr schnell, durch Teilung, sodass man grosse Haufen von runden Formen sieht. Es verdient hervorgehoben zu werden, dass diese Formen häufig keinen gesonderten Blepharoplast zeigen und dass man Bilder trifft, die auf eine Neuentstehung des Blepharoplasten hinweisen. So findet er sich bald im Innern des Kernes, an einem beliebigen Punkte der Kernsaftzone, bald an der Aussenfläche — der Membran anliegend oder vom Nucleus entfernt, aber mit diesem manchmal durch die Centralfaser der heteropolaren Teilung verbunden —; schliesslich kann auch eine solche Verbindung fehlen. Diese Formen sind anfangs geissellos und zeigen in feuchtfixierten und nach ROSENBUSCH gefärbten Präparaten folgende Struktur: das Plasma erscheint alveolär und zeigt in der Oberfläche eine schmale Zone stärkerer Verdichtung, welche den Periplast darstellt. Der runde, im Zentrum der Zelle gelagerte, Kern zeigt ein grosses Caryosom, in dessem Zentrum man bei gut differenzierten Präparaten oft ganz deutlich ein Centriol (Taf. 13, Fig. 9) wahrnimmt. Das Caryosom ist von einem breiten hellen Hofe, der Kernsaftzone umgeben, welche

Sobre o flajelo, geralmente na extremidade delle, é visto muitas vezes um segundo granulo cromatico, menor que o corpusculo bazal, de colorido semelhante ao daquelle. A prezença de tal corpusculo se liga ao mecanismo de formação do flajelo, reprezentando elle, de acôrdo com a teoria de SCHAUDINN, o centriolo da segunda divizão hetero-polar.

Este fato foi tambem verificado por HARTMANN nos microgámetas do proteozoma e por ROSENBUSCH em diversos tripanozómidas.

Em continuação ás fórmas precedentes encontram-se no intestino quilifico organismos mais dezenvolvidos, alguns piriformes, com extremidade afilada, pela qual emerje o flajelo, e o lado oposto mais ou menos rombo, ás vezes regularmente arredondado (Est. 13, Fig. 12, 21 e 22). Nestas fórmas, óra existe flajelo livre, óra só é encontrada a porção intracelular do flajelo; nellas a estrutura é semelhante á descrita para os organismos esfericos sendo, porém, mais acentuadas algumas das minucias estruturais que referimos. Assim é que na membrana do nucleo frequentemente são vistos os granulos cromaticos, o mais das vezes em numero de 8 (Est. 13, Fig. 21) e o blefaroplasto aprezenta estrutura nuclear mais bem caraterizada (Est. 13, Fig. 12 e 21). Nesta faze é comum observar o fenomeno de divizão prévia do nucleo, referido nos flajelados do sangue, sendo demonstrativo deste fato um dos nossos dezenhos (Est. 13, Fig. 22) no qual o cariozoma do nucleo principal mostra dois centriolos, o mesmo acontecendo ao cariozoma do nucleo-blefaroplasto. Neste os dois centriolos se acham ligados por filamento central, que é formado pela divizão do centriolo.

A pozição do blefaroplasto é aqui variavel, sendo elle encontrado quazi sempre atraz do nucleo, afastado da extremidade ponte aguda (Est. 13, Fig. 21 e 22) podendo tambem ser visto ao lado do nucleo principal.

Simultaneamente com os ultimos organismos vêm-se outros menores, geralmente aflajelados (Est. 11, Fig. 58—59) ou só aprezentando a baze do aparelho flajelar, de fórma ovoide, com a estrutura do nucleo e a do

von feinen Linienbälkchen durchsetzt und von einer regelmässig begrenzten Membran umschlossen ist. Diese Membran erscheint bald homogen, bald zeigt sie kleine Chromatin-Granula, die stärker gefärbt und regelmässig, in gleichen Abständen angeordnet sind. (Taf. 13, Fig. 13). An diese Körnchen schliessen sich die Lininfäden, welche vom Caryosom ausgehen.

Der Kern, den ich so beschrieben habe, wie er in der Regel bei den beobachteten Formen auftritt, zeigt oft eine Abänderung; dieselbe bezieht sich hauptsächlich auf die Menge der chromatischen Substanz, welche in der Kernsaftzone enthalten ist; hier tritt das Chromatin manchmal reichlicher auf, sodass es bei einigen Formen an der Innenfläche der Kernmembran ein feines Netzwerk bildet. Es sind dies Bilder, welche (nach der Theorie von HARTMANN) auf zyklische Veränderungen des Caryosoms zurückzuführen sind (Abgabe von Chromatin in die Kernsaftzone) und sich mit ähnlichen Erscheinungen bei der *Amoeba tetragena* vergleichen lassen. Ber Blepharoplast zeigt hier Aehnlichkeit mit dem Bilde, welches von Blutflagellaten beschrieben wurde; er enthält ein grosses Caryosom, welches fast immer von einem dicken und gekrümmten Chromatinbalken gebildet ist (Taf. 13, Fig. 9 und 14), welcher bei jungen geissellosen Formen mit der Konkavität dem Kerne zugewandt ist. Das Caryosom des Blepharoplasten ist von einer hellen Zone umgeben, in welcher weder Chromatin noch Linin sichtbar sind. Es ist dies seine Kernsaftzone, welche durch eine feine, nicht sehr regelmässig konturierte, Membran begrenzt wird.

In dieser und den darauffolgenden Phasen des exogenen Entwicklungszyklus des Flagellaten finden sich, in nach GIEMSA gefärbten Präparaten, intensiv rot gefärbte Granulationen von wechselnder Grösse im Innern des Plasma. Sie entsprechen den von ROSENBUSCH in den Kulturen von *Hämoproteus* beschriebenen und scheinen aus Volutin (SWELLENGREBEL) zu bestehen.

Die Bildung des Geisselapparates beginnt häufig bei diesen runden Formen; man findet dann (Taf. 13, Fig. 9, 11 und 12) als Resultat der heteropolaren Teilung des Blepharoplas-

blefaroplasto identicas á referida. Destas fórmas encontram-se frequentemente aglomerações consideraveis, o que indica, nellas, ativa multiplicação.

Divizão dos flajelados no intestino quilifico.

Em qualquer das fórmas descritas do parazito, a multiplicação, por cizão lonjitudinal, na primeira parte do intestino médio, é muito ativa, sendo encontrados organismos com nucleos e blefaroplastos multiplos, óra com 2 blefaroplastos e 1 só nucleo principal, fato o mais frequente; óra, ao contrario, com 2 nucleos principais e 1 só blefaroplasto; óra, finalmente, com igualdade das duas especies de nucleos. Tambem se observam estadios varios da divizão celular, sendo frequente, nas grandes aglomerações de fórmas esfericas ou ovoides, acharem-se os parazitos ligados entre si por meio de delgadas laminas de plasma. Variantes multiplas de aspeto são ainda vistas, relativas ao nucleo principal e ao blefaroplasto, á prezença ou auzencia de flajelos. Assim é que frequentes vezes vêm-se fórmas com um só nucleo principal e 2 blefaroplastos, cada um destes possuindo um aparelho flajelar. Parece, da maioria de aspetos observados, ser a divizão do nucleo principal quazi sempre precedida pela do blefaroplasto; aliaz nas figuras de mitoze que surpreendémos, o mais das vezes a mitoze do blefaroplasto se acha em faze mais adiantada que a do nucleo principal.

Os preparados fixados secos e córados pelo GIEMSA, nada ensinam dos fenomenos intimos dos 2 nucleos, pelo que, nossas pesquizas sobre este ponto foram feitas com o metodo de ROSENBUSCH. Não nos foi possivel, por emquanto, surpreender todas as fazes da divizão dos nucleos principal e locomotor; procedemos atualmente a novos estudos, cujos rezultados serão referidos mais tarde. Alguns estadios que observámos da mitoze do nucleo principal e do blefaroplasto são muito interessantes, merecendo expozição minucioza. As Figs. 83—86 da Est. 13 reprezentam fazes terminais de mitoze. Nestas mesmas figuras observam-se as telofazes

ten, einen Faserkegel, die Centralspindel, welche den Rhizoplasten umgiebt; erstere zeigt an ihrer Spitze ein Chromatinkorn, das Basalkörperchen, von welchem die Geissel entspringt.

Manchmal haben diese runden Formen keine freie Geissel, sondern nur den intracellulären Teil derselben; doch findet sich bei einem Teil der Organismen eine freie Geissel, die nicht selten eine bedeutende Länge erreicht.

An dieser Geissel, gewöhnlich an ihrem Ende, sieht man häufig ein zweites Chromatinkorn, welches kleiner ist, als das Basalkörperchen, demselben aber in der Färbung gleicht.

Das Vorkommen eines solchen Körperchens entspricht der Bildungsweise der Geissel, indem es nach der Theorie von SCHAUDINN das Centriol einer zweiten heteropolaren Teilung darstellt. Diese Auffassung ist ja auch von HARTMANN für die Mikrogameten von *Proteosoma* und von ROSENBUSCH für verschiedene Trypanosomiden begründet worden.

Einer weiteren Entwicklung der beschriebenen Form entsprechend, findet man im Chylusdarme Organismen, die zum Teil birnförmig sind; vom zugespitzten Ende entspringt die Geissel, während das andere mehr oder weniger stumpf und nicht selten regelmässig gerundet erscheint (Tafel 13, Fig. 12, 21 u. 22). Bei diesen Formen findet sich bald eine freie Geissel, bald nur der intracelluläre Teil einer solchen; ihre Struktur gleicht derjenigen der sphärischen Organismen, doch sind einige der beschriebenen Strukturdetails deutlicher ausgeprägt; so sieht man in der Kernmembran häufig Chromatingranula, gewöhnlich deren acht, (Taf. 13, Fig. 21), und der Blepharoplast zeigt eine deutlichere Kernstruktur (Taf. 13, Fig. 12, u. 21). In dieser Phase beobachtet man häufig die, schon von den Blutflagellaten bekannte, vorläufige Kernteilung, wie dies eine meiner Zeichnungen (Tafel 13, Fig. 22) darstellt, in welcher das Caryosom des Hauptkernes zwei Centriolen zeigt, wie es auch bei den Caryosom des Blepharoplastkernes der Fall ist. Bei diesem finden sich die Centriolen an beiden Enden verbunden durch die Fibrille der Centralfaser, welche durch Teilung des Centriols selbst gebildet wird.

Auch hier ist die Lage des Blepharoplasten

de divizão do blefaroplasto e do nucleo principal. No blefaroplasto, ligando as duas metades da figura, permanece o filamento central do fuzo, cujas extremidades prendem-se aos dois centriolos colocados nos centros dos cariozomas. Num destes ha divizão precoce do centriolo, destinada, talvez, á formação do aparelho flajelar ou á nova mitoze do blefaroplasto. A mitoze do nucleo principal se acha em estadio mais atrazado, vendo-se as duas metades da figura ligadas ainda pelo fuzo central da divizão *(Centralspindel)* em cujo centro existe o filamento central *(Centralfaser),* que tem nas extremidades os dois centriolos. Os novos cariozomas já se acham organizados, e tambem as zonas de suco nuclear, com as membranas envolventes. Fatos similares vêm demonstrados á Fig. 10 da Est. 13. A Fig. 83 da Est. 13 reprezenta a faze terminal da mitoze do nucleo principal, achando-se os 2 nucleos filhos ligados pelo *Centralspindel* (fuzo central e filamento). As substancias dos dois cariozomas aprezentam-se aí dispostas em dois cones, a cujos apices se acham prezas as extremidades do fuzo. Nas Figs. 84 e 85 da Est. 13 vêm-se ainda fazes terminais de mitozes, sendo de notar aí a divizão do centriolo de alguns blefaroplastos.

Estas observações são relativas ás fórmas esfericas aflajeladas, ficando para mais tarde a referencia de fenomenos similares que temos observado em fórmas flajeladas, quer nas fórmas novas, quer em organismos critidiais completamente dezenvolvidas.

Devemos salientar aqui a evidencia do papel do centriolo nas mitozes do nucleo principal e do blefaroplasto, atuando elle, cuja divizão precede sempre á das outras partes do nucleo, como o orgão orientador do fenomeno. E' esta nova demonstração, bem clara, da teoria de v. PROWAZEK e HARTMANN, para quem o centriolo do cariozoma reprezenta, na mitoze dos protozoarios, função identica á do centriolo do centrozomio nas celulas dos metazoarios. Aliaz, observações multiplas sobre fenomenos de divizão nuclear, em outros grupos de protozoarios, fazem-nos absolutamente convencido das idéas daquelles inves-

eine wechselnde; gewöhnlich findet man ihn hinter dem Nucleus, entfernt vom zugespitztem Ende (Taf. 13, Fig. 21 u. 22); doch kann er auch neben dem Hauptkerne getroffen werden.

Gleichzeitig mit den letztbeschriebenen Formen findet man andere kleinere und gewöhnlich geissellose (Taf. 13, Fig. 58-59) oder nur die Basis derselben zeigende, von ovaler Form und mit, wie oben beschrieben, gebildetem Kerne und Blepharoplasten. Dieselben finden sich oft in beträchtlichen Gruppen, was eine rasche Vermehrung andeutet.

Teilung der Flagellaten im Chylusdarme.

Bei allen den oben beschriebenen Parasitenformen ist die Vermehrung durch Längsteilung im Anfangsteile des Mitteldarmes sehr lebhaft, wobei man Exemplare mit mehrfachen Blepharoplasten und Kernen findet; man trifft entweder 2 Blepharoplasten und einen Hauptkern, was am häufigsten vorkommt, oder im Gegenteil 2 Hauptkerne neben einem Blepharoplasten oder endlich beide Kernarten in der gleichen Zahl. Auch beobachtet man verschiedene Stadien der Zellteilung, wobei man in den grossen Haufen von runden und eiförmigen Formen nicht selten durch dünne Plasmenlamellen verbundene Parasiten antrifft. Auch finden sich verschiedene Kombinationen in Beziehung auf Hauptkern und Blepharoplast und das Fehlen oder Vorhandensein von Geisseln.

So findet man häufig Formen mit einem Hauptkern und 2 Blepharoplasten, von denen jeder einen Geisselapparat besitzt. Nach der Mehrzahl der Beobachtungen scheint die Teilung des Hauptkernes gewöhnlich derjenigen des Blepharoplasten zu folgen; übrigens findet sich auch bei den Teilungsphasen, die ich beobachtete, gewöhnlich die Mitose des Blepharoplasten weiter vorgerückt, als diejenige des Hauptkernes.

Trocken fixierte und nach GIEMSA gefärbte Präparate geben über die Einzelheiten der Kernteilung keinen Aufschluss, weshalb ich meine diesbezüglichen Untersuchungen nach ROSENBUSCH'scher Methode anstellte. Bis jetzt gelang es mir nicht, alle Phasen der Teilung

tigadores. Por outro lado, a mitoze do blefaroplasto, que neste parazito aprezenta aspeto de grande nitidez e regularidade, vem confirmar ainda a natureza nuclear daquelle orgão, cuja estrutura, na condição dinamica, quanto na estatica, é inteiramente comparavel á do nucleo principal.

Os nossos rezultados estão, por conseguinte, em pleno acordo com os novos achados de ROSENBUSCH sobre outros tripanozómidas e confirmam a interpretação sobre as condições do nucleo da celula dos tripanozómidas dada por SCHAUDINN e seus sucessores.

Flajelados da porção posterior ou intestiniforme do intestino médio do Conorhinus.

Ainda na porção quilifica do intestino médio, 25 horas apoz a injestão de sangue, encontram-se novas fórmas parazitarias que reprezentam estados evolutivos mais adiantados das fórmas descritas. Aí, porém, tais organismos são raros, parecendo que pouco tempo permanecem, apoz sua formação, neste segmento do tubo dijestivo, depressa passando para a porção cilindrica posterior, onde são vistos em grande numero.

Na porção intestiniforme do intestino médio, desde a 15.ª hora, encontra-se, como dissemos, liquido negro, que reprezenta faze mais adiantada da dijestão do sangue; os parazitos, porém, só aparecem neste liquido depois da 25.ª hora e aí, devido á rapida multiplicação, tornam-se numerozissimos, permanecendo indefinidamente vivos, embóra deixadas as larvas sem alimentação, infetante ou não, durante longos dias.

Estes flajelados são de morfolojia inteiramente identica á dos que existem no intestino de conorrinos adultos, colhidos nas zonas infetadas. Tambem nestes, privados de alimentação por muito tempo, os flajelados permanecem em plena atividade, mostrando mesmo fenomenos de multiplicação.

Os flajelados desta parte do intestino médio aprezentam grande variedade de aspetos, predominando, porém, os organismos critidiformes adultos Fig. 13—20, Est. 13. Estes

des Haupt- und lokomotorischen Kernes aufzufinden; doch bin ich mit weiteren Beobachtungen beschäftigt, über deren Resultate später berichtet werden soll. Einige Stadien der Mitose des Hauptkernes und Blepharoplasten, die ich beobachtete, sind sehr interessant und verdienen eine nähere Beschreibung. Die Fig. 83—86 der Taf. 12 zeigen die Endstadien der Mitose; in denselben Figuren sieht man die Telophasen der Teilung des Blepharoplasten und Hauptkernes. Die beiden Hälften der Figur verbindend, ist im Blepharoplasten die Centralfaser der Spindel erhalten und ihre Enden verbinden die beiden Centriolen, welche im Centrum der Caryosome liegen. Bei einem derselben bemerkt man eine vorzeitige Teilung des Centriols, die scheinbar für die Bildung des Geisselapparates oder eine neue Mitose des Blepharoplasten bestimmt ist. Die Mitose des Hauptkernes ist weniger vorgerückt, indem die Hälften der Teilungsfigur noch durch die Centralspindel und die, in der Mitte gelegene, Centralfaser mit den an beiden Enden gelegenen Centriolen verbunden sind. Die neuen Caryosomen, die Kernzonen und die umhüllenden Membranen sind bereits gebildet. Aehnliche Vorgänge erkennt man in der Fig. 10, Taf. 13. Die Fig. 13 der Taf. 12 zeigt das Ende der Mitose des Hauptkernes, wobei die beiden Tochterkerne durch Centralspindel und -Faser verbunden sind. Die Substanz der beiden Caryosomen erscheint hier in 2 Kegel angeordnet, an deren Spitzen sich die Enden der Spindel anlegen. In den Fig. 84 und 85 der Taf. 12 sieht man auch noch Endstadien der Mitose, wobei man die Teilung der Centriolen einiger Blepharoplaste erkennt.

Diese Beobachtungen beziehen sich auf die Mitose der runden, geissellosen Formen; auf eine spätere Zeit verschiebe ich den Bericht über ähnliche Erscheinungen, die ich an geisseltragenden Formen und zwar teils an jungen Stadien, teils an voll entwickelten Crithidienformen, beobachtet habe.

Ich muss hier die Rolle der Centriolen bei den Mitosen des Kernes und des Blepharoplasten hervorheben, welche sie unzweifelhaft als orientierende Organe des Teilungsphänomens spielen, indem ihre Teilung immer derjenigen

são parazitos alongados, de largura variavel, com ambas as extremidades ponteagudas, aprezentando, na coloração pelo metodo de ROSENBUSCH, plasma alveolar. A extremidade anterior prolonga-se em longo filamento delgado; a posterior, óra termina abruptamente em ponta aguda, óra se mostra arredondada, óra, finalmente, é tambem longa e aguda, menos delgada que a oposta.

O nucleo aprezenta estrutura semelhante á das fórmas anteriores: um cariozoma, em cujo centro é muitas vezes apreciavel centriolo, zona de suco nuclear, atravessada de finas e regulares trabeculas de linina, membrana onde, de regra, é vizivel a diferenciação de 8 ou mais granulos de cromatina. Nas fórmas longas o nucleo principal acha-se situado mais ou menos no meio do eixo lonjitudinal do parazito.

O blefaroplasto mostra, ainda aqui, a nitida estrutura nuclear já descrita. Está situado, óra para frente do nucleo principal, sempre em pozição lateral, nunca no eixo lonjitudinal da celula, óra ao lado do nucleo principal. Nunca, nos flajelados desta zona do tubo dijestivo, é visto o blefaroplasto atraz do nucleo principal.

A baze do aparelho flajelar não oferece neste cazo outras minucias além das referidas; nestes organismos, porém, existe a membrana ondulante, colocada sobre todo o prolongamento delgado anterior da celula e aprezentando, de regra, muitas ondulações.

Além destes flajelados, encontram-se outros, piriformes ou esfericos, nos quais existe prolongamento plasmatico muito fino, munido de membrana ondulante e de flajelo; nestes o flajelo livre é, ás vezes, muito longo, em grande desproporção com as dimensões da celula (Est. 13, Fig. 87).

Estadios intermediarios multiplos, no ponto de vista do aspeto e da fórma geral, existem entre os organismos esfericos pequenos e as fórmas adultas longas de critidias; todos os parazitos, porém, encontrados neste segmento do intestino médio, aprezentam-se munidos de flajelo.

der anderen Kernbestandteile vorangeht. Es bildet dies einen deutlichen Beweis zu Gunsten der Theorie von v. PROWAZEK und HARTMANN, nach welcher das Centriol der Caryosome bei der Mitose der Protozoen dieselbe Funktion hat, wie die Centrosome der Metazoenzelle. Uebrigens haben mich auch vielfältige Beobachtungen über die Kernteilung bei anderen Protozoengruppen vollständig von der Richtigkeit ihrer Anschauungen überzeugt. Auf der anderen Seite dient die, bei diesen Parasiten sehr deutliche und regelmässige, Mitose des Blepharoplasten zur weiteren Bestätigung der Kernnatur dieses Organes, dessen Struktur, ebensowohl im aktiven, wie im Ruhezustande vollständig derjenigen des Hauptkernes gleicht. Meine Resultate stehen somit in vollständiger Uebereinstimmung mit den neuen Befunden von ROSENBUSCH an anderen Trypanosomen und bestätigen die Auffassung der Kernverhältnisse der Trypanosomenzelle, wie sie von SCHAUDINN und seinen Nachfolgern vertreten wird.

Flagellaten des hinteren oder cylindrischen Teiles des Mitteldarmes des Conorhinus.

Noch im vorderen Teile des Mitteldarmes findet man 25 Stunden nach der Blutaufnahme weitere Parasitenformen, welche vorgerückteren Entwicklungsstadien der bereits beschriebenen Formen entsprechen. Doch sind daselbst solche Formen selten und es scheint, dass sie nach ihrer Bildung nur kurze Zeit in diesem Darmabschnitt verbleiben, um bald in den hinteren cylindrischen Teil überzutreten, woselbst sie in grosser Zahl zu finden sind. Im cylindrischen Teile des Mitteldarmes findet man, wie gesagt, von der 15. Stunde an eine schwarze Flüssigkeit, welche das Produkt einer vorgeschritteneren Verdauung des Blutes darstellt; die Parasiten erscheinen jedoch in dieser Flüssigkeit erst nach 25 Stunden und werden hier in Folge einer rapiden Vermehrung äusserst zahlreich, wobei sie sich unbeschränkte Zeit erhalten, trotzdem man die Larven während vieler Tage ohne infektiöse oder anderweitige Nahrung belässt. Diese Flagellaten gleichen in ihrer Morphologie vollständig denjenigen im Darme erwachsener

Nos preparados fixados secos e córados pelo GIEMSA ha só que referir a prezença de abundantes granulos vermelhos, irregularmente espalhados pelo plasma e que são, provavelmente, rezultantes do metabolismo celular. (Fig. 62-69, Est. 11)

Rapida multiplicação experimenta o parazito nesta faze evolutiva, sendo, por isso, encontradas grandes aglomerações de fórmas, ligadas entre si por delgadas pontes plasmaticas, vendo-se tambem critidias plurinucleadas e divizões celulares incompletas. Os flajelados adultos dividem-se lonjitudinalmente, aprezentando diversos aspetos, desde a divizão lonjitudinal binaria, a mais comum, até a divizão lonjitudinal multipla, na qual fórmas aberrantes de critidias, muito volumozas, mostram muitos nucleos.

Os organismos descritos permanecem por tempo indeterminado no intestino e são encontrados nos escrementos, em pequeno numero. Não conhecemos qualquer outra faze que possa ser interpretada como a continuação desta, apezar das numerozas pesquizas realizadas.

Em todos os insetos experimentados, sem uma unica exceção, os fatos passam-se conforme acabámos de referir; algumas experiencias, porém, deixam observar ainda outros fenomenos diferentes que, embóra não esclarecidos de modo satisfatorio, devem ser expostos desde já, visto reprezentarem, a nosso ver, fatos de grande importancia na biolojia do parazito:

Das larvas experimentalmente infetadas algumas mostram, ao lado dos organismos descritos, outros de morfolojia completamente diversa. Assim é que, de 20 a 30 hóras apoz a injestão de sangue, encontrámos em muitas larvas organismos esfericos (Est. 12, Fig. 78—82) munidos de camada periferica condensada, semelhante a membrana, e possuindo grande nucleo que ocupa talvez 2 terços da celula. Este nucleo aprezenta, óra na periferia, óra no centro, um corpusculo de cromatina intensamente córado, com o aspeto de blefaroplasto; este é visto ainda separado do nucleo, colocado na superficie do organismo e fre-

*Conorhinus*wanzen, welche in infizierten Zonen gesammelt wurden. Auch bei diesen bleiben die Flagellaten in voller Tätigkeit, selbst bei lang andauerndem Nahrungsmangel, und zeigen sogar Vermehrungserscheinungen.

In diesem Teile des Mitteldarmes weisen die Flagellaten sehr verschiedene Formen auf, unter denen jedoch die erwachsenen Organismen vom Crithidiatypus vorwiegen. Diese Parasiten sind länglich, von wechselnder Breite, an beiden Enden zugespitzt und zeigen bei der Färbung nach ROSENBUSCH ein alveoläres Protoplasma. Das Vorderende verlängert sich in einen langen dünnen Faden; das hintere endet plötzlich mit einer scharfen Spitze oder zeigt sich abgerundet; endlich kann es auch lang und zugespitzt, aber weniger schlank als das entgegengesetzte, gefunden werden.

Der Kern zeigt eine ähnliche Struktur, wie bei den früher beschriebenen Formen, nämlich: ein Caryosom, in dessen Zentrum man häufig ein Centriol erkennt, eine Kernsaftzone, die von feinen, regelmässigen Linin-Bälkchen durchsetzt ist und eine Kernmembran, von der in der Regel 8 oder mehr Chromatinkörner sich abheben; bei den längeren Formen befindet sich der Hauptkern ungefähr in der Mitte der Längsachse des Parasiten.

Der Blepharoplast zeigt auch hier die bereits beschriebene, deutliche Kernstruktur. Er befindet sich bald zur Seite des Hauptkernes, bald vor demselben, aber immer in seitlicher Lage, niemals in der Längsachse der Zelle; dagegen wird bei den Flagellaten aus diesem Teile des Darmtraktes der Blepharoplast niemals hinter dem Haupkerne gefunden.

Die Basis des Geisselapparates zeigt nur die bereits beschriebenen Details; dagegen findet man bei diesen Organismen eine undulierende Membran, welche dem ganzen dünnen Fortsatze des Vorderendes der Zelle folgt und gewöhnlich viele Wellen zeigt; ausser diesen länglichen Flagellaten findet man andere von Birn- oder Kugelform, bei welchen ein sehr dünner, mit Geissel und undulierender Membran versehener, Plasmavorsatz vorkömmt; bei diesen ist die freie Geissel nicht selten sehr lang und ganz ausser Verhältnis mit den Dimensionen der Zelle (Taf. 2, Fig. 87).

quentemente aprezenta-se bilobado, como se fôra o rezultado da união de 2 corpusculos identicos (Est. 12, Fig. 80—81).

A quantidade destas fórmas era muito variavel, sendo encontradas com abundancia em todas as larvas alimentadas em certos animais e raras ou auzentes nas alimentadas em outros. Do determinismo do aparecimento destes organismos nada sabemos ainda, esperando esclarecel-o bem depressa; é, porém, de notar a frequencia com que os encontrámos nas larvas alimentadas em *Callithrix,* com infeção antiga, ao passo que nas alimentadas em cobaias, mesmo infetadas desde muito, com numerozos parazitos, rarissimas vezes observámos aquellas fórmas. Infelizmente só uzámos, nas pesquizas deste ponto, a fixação a seco e a coloração pelo metodo de GIEMSA, o que explica, em parte, a dificuldade na interpretação dos aspetos observados.

Importantes são ainda as fórmas de esquizogonia que observámos em 3 experiencias, de 140 a 150 horas apoz a refeição, no sangue, em via de dijestão, contido na porção quilifica do intestino médio. Estas se aprezentam constituidas de 8 pequenos organismos mais ou menos ovoides, prezos por massa de plasma central (Est. 12, Fig. 89). Em cada existe um nucleo longo e numa das extremidades um corpusculo de cromatina mais intensamente córado, com o aspeto de blefaroplasto. Aquellas unidades da fórma esquizogonica são vistas, no mesmo material, já separadas (Est. 12, Fig. 90—97), óra em aglomerações, óra izoladas; mostram nitidamente um nucleo principal e um blefaroplasto, tendo, o primeiro, a cromatina, ás vezes, disposta em longa fita e outras já condensada em corpo ovoide. O blefaroplasto, óra está unido ao nucleo, numa das extremidades (Est. 12, Fig. 91), óra delle afastado, ligado ou não por filamento cromatico (Est. 12, Fig. 95—97). E' aspeto estrutural bem tipico dos tripanozómidas, similar, em alguns pontos, ao que se observa nas unidades da esquizogonia no pulmão e tambem em alguns estadios jovens do flajelado, no sangue. Não é possivel duvidar de que estes organismos reprezentam

Zwischen den kleinen runden und den erwachsenen langen crithidienartigen Formen finden sich vielfache Uebergänge in der allgemeinen Gestalt; doch zeigen alle parasitären Formen aus diesem Teile des Mitteldarmes eine Geissel.

Bei trocken fixierten und mit GIEMSA gefärbten Präparaten ist noch das Vorkommen zahlreicher roter Körnchen zu verzeichnen; dieselben sind unregelmässig im Plasma verteilt und müssen wahrscheinlich als Produkte des Stoffwechsels aufgefasst werden (Fig. 62-69, Taf. 11).

In dieser Entwicklungsphase des Parasiten findet eine rasche Teilung statt, weshalb man oft eine grosse Anhäufung von Formen findet, welche unter sich durch feine Plasmabrücken verbunden sind; auch findet man Crithidienformen mit mehreren Kernen und unvollständige Zellteilungen. Die erwachsenen Flagellaten teilen sich der Länge nach und bieten verschiedene Bilder, von der einfachen longitudinalen Zweiteilung bis zur vielfachen Längsteilung, bei welcher aberrante Crithidienformen von grossem Volumen mehrfache Kerne aufweisen.

Die beschriebenen Organismen verharren unbestimmte Zeit im Darme und werden in geringer Zahl in den Exkrementen gefunden. Trotz zahlreicher Untersuchungen kenne ich keine andere Phase, welche als ein weiterer Zustand aufgefasst werden könnte.

Bei sämtlichen untersuchten Insekten beobachteten wir ausnahmslos die soeben beschriebene Reihe von Erscheinungen; doch wurden in einigen Versuchen noch andere Vorkommnisse beobachtet, welche zwar noch nicht genügend aufgeklärt sind, aber doch hier aufgeführt werden müssen, da sie meiner Ansicht nach wichtige Erscheinungen in der Biologie des Parasiten darstellen.

Bei künstlich infizierten Larven zeigen einige neben beschriebenen Formen andere von ganz verschiedener Morphologie. So finden wir 20 bis 30 Stunden nach der Blutaufnahme bei vielen Larven runde Organismen (Taf. 12, Fig. 78-82), die eine verdichtete periphere Schicht aufweisen, welche einer Membran gleicht, und ausserdem einen grossen Kern besitzen,

faze no ciclo do flajelado no inseto, restando apenas conhecer melhor as fazes precedentes e as posteriores a esta. Acreditamos, impressionado pela semelhança dos aspetos cromaticos, que as fórmas de esquizogonia reprezentam a divizão dos organismos esfericos a que nos referimos, as quais seriam, talvez, ooquinetos, rezultantes de fecundação não surpreendida.

Formas parazitarias na cavidade geral do inseto.

Encontrámos fórmas do flajelado, em 2 cazos, na cavidade geral do *Conorhinus*. Estes haviam sido colhidos em habitações infetadas e estavam sem sugar qualquer vertebrado desde muitos dias, não aprezentando vestijio de sangue no intestino quilifico, tendo, porém, no intestino posterior e nos escrementos grande numero de fórmas critidiais.

Nas observações sistematicamente realizadas não conseguimos ainda surpreender parazitos na cavidade geral, pelo que pensámos ser a permanencia delles ali muito tranzitoria, depressa passando ás glandulas salivares.

As fórmas vistas nas duas experiencias são organismos aprezentando longa faixa de cromatina no nucleo e grande blefaroplasto oval, óra situado na extremidade posterior, óra ainda distante desta; possuem membrana ondulante e flajelo livre e aprezentam organização morfologica muito semelhante á das fórmas encontradas nas glandulas salivares (Est. 11, Fig. 71-73).

Fórmas parazitarias encontradas nas glandulas salivares do Conorhinus.

Em 3 experiencias encontrámos, em «*frottis*» de glandulas salivares de conorrinos, fórmas de evolução do *Schizotrypanum cruzi*, as quais reprezentam, sem duvida, os organismos que são inoculados no vertebrado.

Uma das verificações foi feita em inseto adulto que havia picado um *Callithrix* infetado, 12 dias antes. Nesta, em exame a fresco do material das glandulas salivares (glandulas

welcher vielleicht zwei Drittel der Zelle ausfüllt. Dieser Kern zeigt bald im Zentrum, bald an der Peripherie ein intensiv gefärbtes Chromatinkörperchen vom Aussehen eines Blepharoplasten; dasselbe wird auch, vom Kerne getrennt, an der Oberfläche des Organismus gefunden und ist ausserdem oft zweilappig, als ob es aus der Vereinigung zweier gleichartigen Körperchen enstanden wäre (Tafel 12, Fig. 80—81).

Die Zahl dieser Formen war sehr schwankend; ich fand sie in grosser Zahl in allen Larven, welche an bestimmten Tieren gefüttert wurden, dagegen selten oder auch gar nicht bei solchen, deren Nahrung von anderen Tieren stammte. Ueber die Ursache des Auftretens dieses Organismus ist noch nichts bekannt, doch hoffe ich, dieselbe baldigst aufzuklären; jedenfalls ist die Häufigkeit hervorzuheben, mit welcher ich ihn bei den an seit langem infizierten *Callithrix*-Aeffchen gefütterten Larven gefunden habe, während bei andern, mit dem Blute von Meerschweinchen ernährten trotz lange dauernder Infektion und zahlreichen Parasiten im peripherischen Blute diese Formen nur sehr selten beobachtet wurden. Leider benutzte ich bei den diesbezüglichen Untersuchungen nur die trockene Fixation und Färbung nach GIEMSA, was einigermassen die Schwierigkeit der Deutung der beobachteten Bilder erklärt.

Von Wichtigkeit sind auch die Schizogonieformen, welche ich in drei Versuchen, 140 bis 150 Stunden nach der Blutaufnahme, in teilweise verdautem Blute auffand, welches im vorderen Teile des Mitteldarmes enthalten war. Diese zeigen sich aus acht kleinen, nahezu eiförmigen Organismen gebildet, welche durch eine zentrale Plasmamasse zusammenhängen (Taf. 12, Fig. 89); in jedem derselben findet sich ein länglicher Kern und an einem seiner Enden ein intensiver gefärbtes Chromatinkörperchen vom Aussehen eines Blepharoplasten. Die einzelnen Individuen der Schizogonieform werden in demselben Materiale auch getrennt (Taf. 12, Fig. 90—97), bald einzeln, bald in Haufen, gefunden und lassen einen Hauptkern und Blepharoplasten deutlich erkennen; ersterer zeigt das Chromatin manchmal in langer Band-

outros ligados entre si por filamentos de plasma, e, finalmente, organismos com nucleos e blefaroplastos multiplos.

Tornam-se depois flajelados estes organismos, atinjindo o estadio de critidias adultas. Nestas, como nas fórmas anteriores, a estrutura celular é de todo identica á das fazes correspondentes no invertebrado, pelo que nos dispensamos de referil-a. E tambem aqui estamos procedendo a pesquiza sobre os processos de divizão dos nucleos, dos quais daremos, mais tarde, conhecimento.

Nas culturas antigas é frequente observarem-se fórmas aberrantes de critidias, de grandes dimensões, com divizão multipla (Fig. 108 e 109 da Est. 12). As critidias adultas, simultaneamente com organismos piriformes e esfericos, permanecem longamente vivos nas culturas, até 2 mezes, sendo pozitivas, quazi sempre, as 2 primeiras sementeiras.

Nas culturas, portanto, o *Schizotrypanum cruzi* porta-se de modo identico áquelle estudado no tubo dijestivo do hemiptero, havendo perfeita semelhança em quazi todas as fazes das evoluções na cultura e no hospedeiro intermediario. Não encontrámos, porém, nas culturas artificiais, os organismos esfericos, cercados de pelicula condensada, nem as fórmas de esquizogonia assinaladas no tubo dijestivo do inséto. Em compensação, duas culturas de sangue de sagui mostraram, no fim de 10 dias, fórmas parazitarias que não haviamos observado ainda. Nestes, vimos flajelados com blefaroplasto colocado atraz do nucleo principal, achando-se este ultimo com a cromatina disposta em longa faixa lonjitudinal. E' um aspeto muito semelhante ao observado em parazitos adultos das glandulas salivares e tambem do sangue periferico.

Outra fórma tambem encontrada só duas vezes nas culturas, aprezentava-se ovoide, tendo nucleo unico com a cromatina disposta em dois lóbos. O aspeto desta fórma, nos preparados, fixados secos e córados pelo GIEMSA, lembrava muito o ooquineto do hemoproteo. Indecizas, porém, como se aprezentam, estas fazes ultimas exijem maiores e

zeigte die Mehrzahl der Hemipteren zwar Flagellaten im Hinterdarm, aber keine in den Speicheldrüsen; ein unbestimmter, aber sehr kleiner (nur nach Hundertsteln zählender) Teil war gleichzeitig infiziert und infizierend, indem er in den Speicheldrüsen die beschriebenen Parasiten enthielt. Diese Beobachtung wird übrigens bestätigt durch die Versuche, mittelst des Stiches von in menschlichen Wohnungen gesammelten Conorhinen zu infizieren, wobei nur ein kleiner Teil dieser Wanzen sich infektiös erweist.

Künstliche Kultur des Parasiten.

Das *Schizotrypanum cruzi* lässt sich leicht nach NOVY und MAC NEAL auf Blutagar züchten. Bei meinen Kulturen verfahre ich folgendermassen: Ich entnehme das Blut aus dem Herzen von Kaninchen, ein Prozess, der dem Durchschneiden der Karotiden vorzuziehen ist, da man, ohne das Tier zu opfern, in jeder Sitzung bis 40 ccm. Blut entnehmen kann. Ich mische gleiche Teile des defibrinierten Blutes mit gleichen Teilen geschmolzenen, bei 50° aufbewarten Agars und übertrage auf das gewöhnlich reichliche Kondenswasser.

Systematische Untersuchungen zeigen die ersten Modifikationen der Flagellaten von der 6. Stunde an, wobei hier, wie im Darmkanale des Zwischenwirtes, die Anfangserscheinungen folgende sind: Wanderung des Blepharoplasten in die Nähe des Hauptkernes, Verlust der Geissel und undulierenden Membran, endlich die Abrundung des Parasiten (Taf. 13, Fig. 23 a — 23 b). Hierauf folgt eine rasche Vermehrung, sodass nach 20 Stunden in der Kultur neue Organismen erscheinen, welche aus der Teilung der eingesäten Flagellaten enstehen und eine runde und eiförmige Gestalt besitzen (Taf. 12, Fig. 98 — 103 und Taf. 13, Fig. 23).

Anfangs herrschen kleine, birnförmige, geissellose Organismen (Taf. 12, Fig. 99—102) vor, welche bei der Färbung nach ROSENBUSCH dieselbe Struktur zeigen, wie die entsprechenden Formen aus dem *Conorhinus*. In GIEMSA-Präparaten sieht man in diesen

mais metodicas pesquizas, pelo que deixamos de aprezentar agóra os dezenhos e os dados sobre a estrutura dellas.

Transmissão da infeção pela picada do Conorhinus e por injeção dos flajelados do tubo dijestivo e das culturas. Virulencia variavel do parazito. Evolução da infeção nos animais de laboratorio.

Conforme referimos, o primeiro cazo de infeção pelo *Schizotrypanum cruzi* foi obtido num *Callithrix* picado por alguns conorrinos trazidos da zona contaminada. Os insétos estavam, havia mais de 8 dias, sem refeição em qualquer vertebrado, o que indica, já neste primeiro cazo, a auzencia de transmissão mecanica do parazito. Maiores ensinamentos, porém, oferecem as experiencias seguintes, realizadas com larvas, nacidas no laboratorio, como passamos a referir:

Quatro larvas, no 5.º dia apoz a eclosão, picaram um *Callithrix* infetado desde 1 mez, com flajelados não muito abundantes no sangue periferico.

Duas destas larvas, 10 dias depois, picaram uma cobaia que morreu no 6.º dia aprezentando no pulmão grande numero de fórmas de esquizogonia e no sangue periferico alguns parazitos intraglobulares. As 2 larvas restantes infetaram mais 2 cobaias, uma das larvas no 20.º e a outra no 25.º de infeção. Uma dessas cobaias morreu no 7.º dia apoz a picada, com grande numero de fórmas de esquizogonia no pulmão, sem flajelados, apreciaveis em exame rapido, no sangue periferico; a outra cobaia morreu no 12.º dia, aprezentando algumas fórmas de esquizogonia no pulmão e raros flajelados no sangue periferico.

Nova experiencia, com 6 larvas, 3 dellas alimentadas em *Callithrix* com infeção antiga e 3 alimentadas em cobaia com numerozos parazitos no sangue periferico, deu o seguinte rezultado: as 3 larvas, infetadas no *Callithrix*, picaram no 8.º dia uma cobaia, que mostrou parazitos no sangue periferico 15 dias depois; as larvas alimentadas na co-

Formen den Hauptkern als grosse Chromatinmasse, welche an einem beliebigen Punkte der Peripherie den Blepharoplasten aufweist.

Auch die runden Formen von wechselnden Dimensionen zeigen nur die bei Insekten beschriebenen Strukturverhältnisse. In GIEMSA-Präparaten sieht man im Plasma ausser den Volutinkörperchen nicht selten zahlreiche Vakuolen.

Runde und birnförmige Formen zeigen sich in Anhäufungen, die oft von sehr zahlreichen Individuen gebildet sind, unter welchen viele Kernteilungen aufweisen, andere mehrfache Blepharoplasten und Kerne enthalten und wieder andere durch Plasmafäden gegenseitig verbunden sind.

Diese Organismen bilden dann eine Geissel und gehen in die erwachsene Crithidienform über, bei welcher, wie bei den vorigen, die Zellstruktur den entsprechenden Formen aus der Wanze entspricht, weshalb ich sie auch nicht beschreibe. Ich untersuche auch bei diesen den Kernteilungsprozess und werde darüber später berichten. In älteren Kulturen beobachtet man häufig abweichende Crithidienformen von grossen Dimensionen und in mehrfacher Teilung begriffen (Taf. 12, Fig. 108 u. 109). Kugel- und Birnformen bleiben neben den erwachsenen Crithidien in den Kulturen lange Zeit — bis zu 2 Monaten — am Leben und die beiden ersten Ueberimpfungen gehen fast immer gut an.

Das *Schizotrypanum cruzi* verhält sich demgemäss in den Kulturen ganz wie im Darme der Wanze, sodass fast alle Entwicklungsphasen vollständig übereinstimmen. Doch fand ich in den künstlichen Kulturen weder die runden, von einer verdichteten Membran umgebenen Organismen, noch die im Darmkanal nachgewiesenen Schizogonieformen. Dagegen zeigten 2 Kulturen aus dem Blute des Pinseläffchens nach 10 Tagen parasitäre Formen, welche ich noch nicht beobachtet hatte. Hier sah ich Flagellaten mit hinter dem Hauptkerne liegenden Blepharoplasten, wobei der letztere das Chromatin zu einem langem Streifen angeordnet zeigte. Dieses Bild gleicht demjenigen des erwachsenen Parasiten aus dem peripheren Blute und den Speicheldrüsen.

baia picaram sem rezultado novas cobaias no 8.º, no 14.º e no 20.º dias.

Grande numero de outras experiencias, com larvas nutridas em cobaias intensamente infetadas, foram negativas, não obstante aprezentarem todas as larvas, com absoluta constancia, as fórmas de critidias que referimos no intestino médio. Tambem o exame do liquido da cavidade geral e as pesquizas das glandulas salivares destas larvas deram rezultados negativos. Nas larvas cujas picadas foram contaminantes para cobaias não fizemos, devido ao intuito de apreciar o prazo maximo da condição infetante, pesquizas complementares nas glandulas salivares, perdendo as larvas sem ter tido esclarecimento importante que tais pesquizas poderiam trazer.

Temos diversas experiencias de infeção de cobaias por picada de conorrinos adultos; nestas, porém, devido á possibilidade de serem infetantes os insétos colhidos na zona contaminada, não se póde apreciar o tempo de evolução completa do parazito. Da relação centezimal de conorrinos infetantes, quando colhidos em habitações humanas, não temos por emquanto idéa exata; é certo, porém, que naquella relação influe especialmente a procedencia dos insétos. Tivemos coleções de conorrinos, da mesma procedencia, nas quais existiam muitos insétos infetantes; quando com outras coleções, de procedencia diversa, as tentativas de infeção foram todas negativas.

Podemos, das experiencias até agora realizadas, tirar as concluzões seguintes sobre a transmissão do *Schizotrypanum cruzi* pela picada do *Conorhinus:*

1.º Certa proporção, indeterminada, de conorrinos colhidos nas habitações de zona contaminada, é infetante para os vertebrados.
2.º As larvas creadas no laboratorio e alimentadas em animais contaminados, mesmo com numerozos parazitos no sangue periferico, nem sempre se tornam infetantes, apezar de aprezentarem flajelados no intestino médio.
3.º As larvas que, em tal cazo, se tornam contaminantes, só o são, desde o 8.º ou 10.º

Eine zweite Form wurde gleichfalls zwei mal in den Kulturen beobachtet; sie ist oval und zeigt einen einzelnen Kern, dessen Chromatin in 2 Lappen angeordnet ist. Die Form derselben erinnert in trocken fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten sehr an den Ookineten des *Hämoproteus.* Da sich jedoch diese letzten Formen nicht sehr deutlich erscheinen, sind noch mehr eingehende und methodische Untersuchungen nötig, weshalb ich jetzt keine Zeichnungen und nähere Angaben über ihre Struktur gebe.

Uebertragung der Infektion durch den Stich des Conorhinus, die Flagellaten aus dem Darmkanal und die Kulturformen.

Wie schon berichtet, wurde die erste Infektion durch *Schizotrypanum cruzi* bei einem Pinseläffchen beobachtet, an welchem aus infizierter Zone stammendende Conorhinen gesogen hatten. Dieselben hatten seit mehr als 8 Tagen kein Blut aufgenommen, was bereits in diesem ersten Falle die mechanische Uebertragung des Parasiten ausschloss. Genauere Aufschlüsse erhielt ich aus den folgenden Versuchen mit Larven, die im Laboratorium ausgeschlüpft waren:

Fünf Tage nach dem Ausschlüpfen sogen 4 Larven an einer seit einem Monate infizierten *Callithrix* mit sehr zahlreichen Flagellaten im peripheren Blute. 10 Tage darauf stachen 2 dieser Larven ein Meerschweinchen; dasselbe starb am 6. Tage und zeigte in den Lungen zahlreiche Schizogonieformen und im peripherischen Blute einige intraglobuläre Parasiten. Die 2 übrigen Larven infizierten 2 Meerschweinchen, eine derselben am 20., die andere am 25. Tage nach der Infektion. Das eine Meerschweinchen starb 7 Tage nach den Stichen mit zahlreichen Schizogonieformen in den Lungen, während im peripherischen Blute eine nicht sehr eingehende Untersuchung keine Flagellaten nachwies; das andere Versuchstier starb am 12. Tage und zeigte in den Lungen einige Schizogonieformen nebst spärlichen Flagellaten im peripheren Blute.

Ein neuer Versuch wurde mit 6 Larven angestellt; davon hatten 3 an einer seit lan-

dia apoz a refeição de sangue infetado, conservando essa condição por espaço de tempo longo e ainda indeterminado.

4.º As picadas de larvas, 2 ou 3 dias depois de uma refeição em animal infetado, não contaminam os vertebrados.

Claro está que estas concluzões, embora bazeadas em experiencias izentas de qualquer cauza de erro, não trazem ao assunto esclarecimento completo, sendo necessario aguardar o rezultado das novas pesquizas a que procedemos atualmente.

Obtivémos, inoculando material do intestino médio de conorrinos adultos, colhidos em habitações humanas e sem prévia refeição contaminada no laboratorio, a infeção de diversas cobaias, as quais chegaram a aprezentar, no sangue periferico, numerozos flajelados.

Com o material do intestino médio de larvas, infetadas no laboratorio, conseguimos tambem a infeção de diversas cobaias. Fizemos inoculações, neste cazo, depois de 6 dias da refeição contaminante, não tendo ainda experimentado antes daquelle prazo, o que devemos fazer ainda. Nas inoculações do material do intestino de larvas e de conorrinos adultos, tivemos alguns rezultados negativos, sem que possamos por emquanto explicar a causa delles. Aliaz, ainda neste ponto, para maior segurança das concluzões, devemos voltar á novas pesquizas.

A inoculação de cultura não oferece concluzão diversa da inoculação do material do intestino médio; muitas vezes infetámos cobaias com inoculações de culturas, falhando porém, algumas das experiencias realizadas.

Variabilidade na virulencia do Schizotrypanum cruzi.

A virulencia do *Schizotrypanum cruzi* é influenciada por diversos fatores, cuja natureza e cujos efeitos não conhecemos ainda, de modo exato.

Passajens sucèssivas do parazito, atravez de animais sensiveis atenuam, sem duvida, a virulencia delle; por outro lado, o parazito,

gem infizierten *Callithrix*, die anderen 3 an einem Meerschweinchen mit zahlreichen Parasiten im peripheren Blute gesogen. Das Resultat des Versuches war folgendes: die 3 am Affen infizierten Larven stachen am 8. Tage ein Meerschweinchen, welches 15 Tage später Parasiten im peripheren Blute zeigte; die Larven vom Meerschweinchen stachen am 8., 14. und 20. Tage andere Meerschweinchen mit negativem Resultate.

Noch viele andere Versuche mit Larven, die an stark infizierten Meerschweinchen gesogen hatten, blieben resultatlos, obwohl die Larven mit absoluter Sicherheit die erwähnten Crithidienformen im Mitteldarme aufwiesen. Ebenso blieben die Untersuchungen der Flüssigkeit aus der Leibeshöhle und die der Speicheldrüsen ohne Resultat. Dagegen machte ich keine Kontrollversuche an den Speicheldrüsen der Larven, deren Stich Meerschweinchen infiziert hatte, da ich dieselben zur Feststellung der längsten Dauer der Infektion gebrauchte; so verlor ich die Larven, ohne die wichtige Aufklärung zu erhalten, welche diese Versuche hätten geben können.

Ich machte auch verschiedene Infektionsversuche am Meerschweinchen, die ich von erwachsenen Conorhinen stechen lies; doch liess sich bei solchen die Entwicklungsdauer des Parasiten nicht feststellen, weil diese in infizierter Zone gesammelten Insekten schon infektiös sein konnten. Ueber den Prozentsatz der Infektiosität der in menschlichen Wohnungen gefangenen Conorhinen habe ich keinen richtigen Begriff, doch steht soviel fest, dass derselbe besonders von der Herkunft der Tiere abhängt. So fanden wir in einer Sendung von Conorhinen von einem Orte zahlreiche infektiöse Exemplare, während bei Sendungen von anderer Herkunft alle Infektionsversuche resultatlos blieben.

Aus den bisher angestellten Untersuchungen über die Uebertragung des *Schizotrypanum cruzi* durch den Stich des *Conorhinus* kann ich folgende Schlüsse ziehen:

1. Ein unbestimmter Prozentsatz von aus Wohnungen der infizierten Zone stammenden Conorhinen ist für Wirbeltiere infektiös.

atenuado, readquire a virulencia inicial, quando inoculado em outra especie animal. As infeções produzidas nas cobaias por picadas de conorrinos são, de regra, mais graves que as produzidas por inoculações de sangue contaminado. As primeiras matam o animal em espaço de tempo variavel, comumente de 5 a 10 dias, ao passo que as ultimas permitem a sobre-vida até de 2 mezes. E' frequente, nas infeções pelo *Conorhinus,* as cobaias morrerem ainda com auzencia de flajelados no sangue periferico, aprezentando no pulmão grande numero de fórmas esquizogonicas.

As reinoculações de sangue de cobaias, inicialmente infetadas pelo inséto, modificam consideravelmente, tanto a ação patojenica, quanto a atividade de multiplicação do parazito, de modo que, apoz certo numero de reinoculações, as infeções obtidas tornam-se menos intensas e a morte das cobaias mais demorada. Si, porém, inoculamos o parazito assim tratado num *Callithrix,* parece que elle readquire, em parte, a virulencia perdida.

Influe, ainda na intensidade da parazitoze, a via de introdução do flajelado, parecendo, de nossas experiencias, serem as inoculações intra-peritoneais as que produzem infeções maiores e mais rapidamente mortais.

Sobre este ponto merecem referencia especial nossas observações sobre o tripanozómida de proveniencia humana: Inoculámos, como dissémos, 2 cobaias e um *Callithrix,* com sangue da primeira doente, morrendo aquellas duas em poucos dias e sobrevivendo o *Callithrix* 2 mezes, vindo a morrer em estado de grande emagrecimento e de consideravel hipoglobulia. Inoculámos, com o sangue do *Callithrix,* 6 cobaias que mostraram, apoz 15 dias, parazitos no sangue periferico, morrendo todas dentro de 1 mez. Com sangue destas cobaias inoculámos novas, que só muito tarde, 20 ou 30 dias depois, aprezentaram parazitos na periferia. Estas cobaias viveram mais de dois mezes, morrendo em varios periodos, quazi todas mostrando, na ocazião da morte, fórmas esquizogonicas no pulmão. Houve, portanto, nesta série de experiencias uma primeira atenuação de virulencia pela passajem no *Callithrix,* visto como

2. Im Laboratorium aufgezogene, an infizierten Tieren mit zahlreichen Parasiten im peripheren Blute gefütterte, Conorhinuslarven zeigen sich nicht immer infektiös, obwohl sie Flagellaten im Mitteldarme beherbergen.
3. Die Larven, welche unter solchen Verhältnissen sich infektiös erweisen, tun es erst am 8. bis 10. Tage nach der Aufnahme des infizierten Blutes, behalten aber diese Eigenschaft während eines langen Zeitraumes, dessen Grenzen noch nicht bestimmt sind.
4. 2 bis 3 Tage nach Aufnahme des infizierten Blutes sind die Stiche der Larven nicht infektiös für Wirbeltiere.

Obwohl die Schlüsse auf von Fehlerquellen reinen Versuchen beruhen, können sie doch natürlicherweise die Frage nicht vollständig aufklären; deswegen muss das Resultat neuer Versuche, mit denen wir zur Zeit beschäftigt sind, abgewartet werden.

Durch Einspritzung des Mitteldarminhaltes erwachsener, aus menschlichen Wohnungen stammender Conorhinen, die im Laboratorium kein infiziertes Blut aufgenommen hatten, erhielt ich eine Infektion bei verschiedenen Meerschweinchen, welche später im Blute zahlreiche Flagellaten aufwiesen. Auch mit Material aus dem Mitteldarm von — im Laboratorium infizierten — Larven, bewirkte ich eine Infektion bei verschiedenen Meerschweinchen. Dabei stammte das Infektionsmaterial aus der Zeit nach dem 6. Tage der Infektion; Versuche vor dieser Zeit wurden nicht angestellt, sollen aber noch gemacht werden. Bei der Uebertragung von Material aus dem Darme von Larven und erwachsenen Exemplaren dieser Wanzen erhielten wir einige negative Resultate, ohne zur Zeit die Ursache derselben erklären zu können. Uebrigens werden wir auch hierüber zu grösserer Sicherheit in unseren Schlüssen weitere Untersuchungen anstellen.

Die Uebertragung von Kulturen gestattet keine anderen Schlüsse, als die Einspritzung von Material aus dem Mitteldarme; manchmal infizierte ich Meerschweinchen mit Einsprit-

o parazito humano, que a principio matou cobaias em 5 dias, só o fez depois em 1 mez ou pouco menos. Segunda e mais intensa atenuação sofreu o virus no organismo das cobaias, conforme o rezultado das reinoculações, que só mataram os animais depois do 2.º mez.

A grande virulencia do parazito humano para as cobaias revelou-se outra vez na inoculação de sangue do doente JOSE, em dois destes animais, que morreram dentro de poucos dias e na terceira experiencia, na qual obtivémos a infeção de uma cobaia (que permaneceu viva mais de um mez) a quantidade de sangue inoculado foi de menos de $^1/_2$ cc., quando nos 2 primeiros cazos injetámos no peritoneo das cobaias, de 1 a 2 ccm.

Convém assinalar aqui a intensidade diversa da infeção dos doentes, o que impossibilita tirar destes rezultados, a respeito da virulencia do parazito, concluzões definitivas. De fato no primeiro doente havia flajelados no sangue periferico, apreciaveis mesmo em exame rapido, ao passo que nos outros só a inoculação de animais sensiveis póde revelar a existencia da infeção.

Evolução da molestia na cobaia e no Callithrix.

A evolução da esquizotripanozomiase nos animais de experiencia depende, sobretudo, da proveniencia do parazito. Póde ser estabelecida como regra, a morte rapida dos animais, ás vezes com flajelados raros ou sem elles no sangue periferico, quando infetados pelo *Conorhinus*. Nas inoculações sucessivas, porém, na mesma especie animal, a sobrevida póde ser longa, atinjindo 2 mezes e mais na cobaia e no *Callithrix*. Ha, nestes cazos, periodos de maior abundancia de parazitos no sangue periferico. Em alguns animais observámos dezaparecimento rapido dos flajelados da periferia, lembrando as crizes verificadas em algumas espiroquetozes. Outra observação, muitas vezes repetidas, é a da morte dos animais em periodo de ativa esquizogonia do parazito. As cobaias aprezentam, nestas condições, os capilares do pulzung von Kulturen, während wieder andere Versuche resultatlos blieben.

Schwankungen in der Virulenz von Schizotrypanum cruzi.

Die Virulenz von *Schizotrypanum cruzi* steht unter dem Einflusse verschiedener Faktoren, deren Natur und Wirkungen noch nicht genau bekannt sind. Wiederholte Passagen durch empfindliche Tiere schwächen die Virulenz in deutlicher Weise ab; andererseits nimmt der Parasit nach der Abschwächung die ursprüngliche Virulenz wieder an, wenn er auf eine andere Tierart übertragen wird. Die Infektionen, welche bei Meerschweinchen durch die Stiche von Conorhinen erzeugt werden, sind in der Regel schwerer, als diejenigen, die durch Einführung infektiösen Blutes entstehen. Erstere töten die Tiere nach einem wechselnden Zeitraum von gewöhnlich 5 bis 10 Tagen, während letztere ein Ueberleben bis zu 2 Monaten gestatten. Bei Infektion durch Conorhinen sterben die Meerschweinchen nicht selten schon, wenn noch keine Flagellaten im peripheren Blute vorkommen, während in den Lungen zahlreiche Schizogonieformen zu finden sind.

Die Ueberimpfung des Blutes von ursprünglich durch den Stich von Conorhinen infizierten Meerschweinchen bewirkt eine beträchtliche Aenderung in Beziehung auf die Vermehrungsenergie der Parasiten, so dass nach einer gewissen Zahl von Passagen die erzeugten Infektionen weniger intensiv werden und der Tod der Meerschweinchen sich verzögert. Uebertragen wir jedoch den so behandelten Parasiten auf eine *Callithrix*, so scheint er die verlorene Virulenz teilweise wieder zu gewinnen.

Auch der Ort der Einimpfung beeinflusst die Intensität des parasitären Prozesses; nach meinen Experimenten scheinen intraperitoniale Einspritzungen die stärksten und am schnellsten tödtlichen Infektionen hervorzurufen.

Hier verdienen die Versuche mit Trypanosomen menschlicher Herkunft besonders Erwähnung; wie berichtet, infizierte ich mit

mão repletos de fórmas esquizogonicas, coincidindo o fato com diminuição e ás vezes dezaparecimento dos flajelados do sangue periferico.

Entre os sintomas que se observam nos animais de experiencia, além de elevação termica, grande emagrecimento e hipoglobulia, devemos referir o enfartamento ganglionar generalizado, em alguns cazos muito consideravel, e afeções oculares. Esta é muito frequente no *Callithrix* e não raro determina a perda completa da vizão. Finalmente, registrámos a observação frequente da morte dos animais em convulsão.

Considerações gerais.

I. Sistematica.

A existencia de relações filojeneticas, muito estreitas, entre os tripanozomos e os parazitos hematicos intra-globulares, foi primeiro revelada, em 1904, pelas memoraveis pesquizas de SCHAUDINN sobre o ciclo evolutivo do *Haemoproteus noctuae* e do *Leucocytozoon ziemanni*. Nellas o grande pesquizador demonstrou, no organismo do vertebrado, para o *Haemoproteus*, a alternancia de fazes de repouzo intraglobulares, aflajeladas, com a de flajelados livres no plasma. No *Culex pipiens*, de uma fecundação oogamica entre elementos sexuados tipicamente halteridicos, rezultaria um ooquineto, cuja evolução conduziria a parazitos flajelados. No *Leucozytozoon ziemanni* o ooquineto daria logar, por divizão multipla, á formação de organismos espiroquetiformes, com morfolojia de todo ponto identica á dos tripanozomos tipicos.

Inumeras vezes contestadas, sem que, entretanto, a auzencia de verdade nella tenha sido até agóra demonstrada, de modo seguro, as observações de SCHAUDINN patentearam o estreito parentesco entre os tripanozomos e o grupo de protozoarios hematicos, até então autonomo e que parecia bem delimitado, dos denominados hemosporidios.

O fundo de verdade daquellas observações veiu, bem depressa, revelar-se em outras pesquizas, nas quais protozoarios intracelu-

dem Blute der ersten Patienten zwei Meerschweinchen und eine *Callithrix*, wobei erstere nach wenigen Tagen starben, während der Affe noch zwei Monate lebte und im Zustande grosser Abmagerung und bedeutender Hypoglobulie zu Grunde ging. Mit dem Blute der *Callithrix* impfte ich sechs Meerschweinchen, welche nach 15 Tagen im peripheren Blute Parasiten aufwiesen und innerhalb eines Monates starben. Mit dem Blute dieser Meerschweinchen impfte ich andere, welche die Parasiten erst viel später — 20 bis 30 Tage nachher — im peripheren Blute zeigten. Sie lebten mehr als zwei Monate und starben nach verschiedener Zeit, wobei fast alle Schizogonieformen in den Lungen aufwiesen. Bei dieser Versuchsreihe beobachtete man also eine primäre Virulenzverminderung nach der Passage durch die *Callithrix*, indem der vom Menschen stammende Parasit, der ursprünglich Meerschweinchen in 5 Tage tötete, dies nun erst nach einem Monate oder nur wenig früher tat. Eine zweite, noch intensivere Abschwächung erlitt das Virus im Organismus der Meerschweinchen, wie der Erfolg der Weiterimpfungen zeigt, welche den Tod der Tiere erst nach mehr wie 2 Monaten zur Folge hatten.

Die grosse Virulenz des menschlichen Parasiten für Meerschweinchen zeigte sich wieder bei der Uebertragung des Blutes von dem Patienten JOSE auf zwei dieser Tiere, welche nach wenigen Tagen starben. Bei einem dritten Versuche, in welchem ein Meerschweinchen infiziert wurde und mehr wie einen Monat am Leben blieb, war die Menge des übertragenen Blutes weniger als $^1/_2$ cc, während ich von den beiden ersten Kranken je 1 bis 2 cc. in die Bauchhöhle der Meerschweinchen einspritzte.

Es muss hier die verschiedene Intensität der Infektion bei den einzelnen Patienten betont werden, welche es unmöglich macht, aus diesen Resultaten endgültige Schlüsse auf die Virulenz der Parasiten zu ziehen. So waren bei den ersten Patienten schon bei flüchtiger Untersuchung Parasiten im peripheren Blute nachzuweisen, während bei den anderen die Infektion nur durch Einimpfung empfindlicher Tiere nachgewiesen werden konnte.

lares aflajelados mostraram, nas culturas artificiais, fórmas flajeladas com aspeto morfolojico das critidias. Assim MYAJIMA obteve, nas culturas de piroplasma, fórmas de flajelados que o pesquizador supõe serem fazes evolutivas daquelle parazito. O mesmo rezulta das pesquizas de ROGERS e CH. NICOLLE, com a *Leishmania,* que daria, nas culturas, fórmas flajeladas bem carateristicas.

Por outro lado, os metodos modernos de citolojia dos protozoarios vieram ainda, *maxime* nos trabalhos de HARTMANN e PROWAZEK, revelar um outro carater comum aos dois grupos de parazitos, hemosporidios e tripanozómidas. Referimo-nos a dualidade nuclear, bem nitida nos generos *Trypanosoma*, *Crithidia* e *Herpetomonas,* sendo aí o segundo nucleo, o locomotor, reprezentado pelo blefaroplasto.

Nos hemosporidios, algumas vezes, aspeto morfolojico analogo ao dos tripanozomos é encontrado numa faze qualquer do ciclo evolutivo, confórme verificaram SCHAUDINN, nos merozoitos e esporozoitos da malaria, e HARTMANN, naquelles e no microgámeta do proteozoma.

Quando assim não é, na auzencia de qualquer aparelho flajelar, não raro é possivel verificar a dualidade de nucleos, mesmo em fórmas de repouzo intraglobulares. E' o que acontece nas hemogregarineas (V. PROWAZEK) no esporozoito da malaria (ED. e ET. SERGENT), na *Lankesterella ranarum* (FRANÇA, BILLET e BRUMPT) no *Halteridium* (HARTMANN e WOODCOCK), no *Piroplasma bigeminum* etc. Ainda assim a autonomia e a delimitação dos hemosporidios, delles com os flajelados incluidos na antiga familia de tripanozomidas, parecia ter baze solida em condições biolojicas carateristicas, como fossem a multiplicação por meio de fórmas esquizogonicas regulares e a constancia do parazitismo intra-celular. Estas duas condições, aliaz, acham-se ligadas por uma relação de dependencia, sendo a multiplicação esquizogonica, provavelmente, consequencia do parazitismo intra-celular (HARTMANN). Nem faltam aqui, no processo de multiplicação, fórmas de aproximação entre os tripanozó-

Verlauf der Krankheit bei Meerschweinchen und Callithrix.

Der Verlauf der Infektion mit *Schizotrypanum cruzi* bei Versuchstieren hängt besonders von der Herkunft des Parasiten ab. Als Regel gilt der rasche Tod der Tiere — nicht selten mit wenigen oder ganz fehlenden Parasiten im peripherischen Blute — bei der Infektion durch Conorhinen. Bei derselben Tierart kann jedoch bei späteren Uebertragungen das Leben länger erhalten bleiben und zwar bis zu 2 Monaten und länger bei Meerschweinchen und *Callithrix.* In solchen Fällen gibt es Perioden, in welchen die Parasiten im peripheren Blute zahlreicher erscheinen. Bei einigen Tieren beobachtete ich rasches Verschwinden der Parasiten von der Peripherie, was an die Krisen erinnert, welche bei Spirochätosen beobachtet werden. Eine andere, häufig wiederholte, Beobachtung betrifft den Tod der Tiere in einer Periode aktiver Schizogonie des Parasiten. Die Meerschweinchen zeigen in diesem Falle die Lungenkapillaren voll von Schizogonieformen, während gleichzeitig die Flagellaten im peripheren Blute abnehmen oder ganz fehlen.

Von Krankheitssymptomen, welche bei Versuchstieren beobachtet werden, müssen — neben Temperatursteigerungen, starker Abmagerung und Hypoglobulie — allgemeine, manchmal sehr beträchtliche Lymphdrüsenanschwellungen und Augenaffektionen, besonders Keratitis hervorgehoben werden. Letztere ist bei der *Callithrix* besonders häufig und bedingt nicht selten vollständigen Verlust des Sehvermögens. Endlich erwähne ich den häufig beobachteten Tod des Tieres unter Konvulsionen.

Allgemeine Betrachtungen.

1. KLASSIFIKATION.

Das Bestehen engerer phylogenetischer Beziehungen zwischen den Trypanosomen und den intraglobulären Blutparasiten wurde zuerst 1904 durch die denkwürdigen Forschungen aufgedeckt, welche SCHAUDINN über den Entwicklungszyklus des *Haemoproteus noctuae* und *Leukocytozoon Ziemanni* machte. In diesen

midas e os hemosporidios. Assim temos como aperfeiçoamento á cizão binaria do *Trypanosoma brucei* e de outras especies, a cizão multipla do *Trypanosoma lewisi,* nos orgãos internos com aspeto de rozaceas, cujas unidades são em numero variavel; e tambem no *Trypanosoma rotatorium,* no sangue periferico, a divizão em 4 ou mais unidades, realizada em organismos arredondados (observação inedita no Instituto de Manguinhos).

Nos hemosporidios, a auzencia de aparelho flajelar, que muitas vezes tem reprezentação parcial no blefaroplasto, significa na opinião de HARTMANN, um fenomeno de redução, dependente da vida intracelular do parazito. Nesse ponto o *Haemoproteus,* pela alternancia de fazes intraglobulares com blefaroplasto e auzencia de flajelo e de fórmas flajeladas no plasma, reprezenta tranzição, bem carateristica, entre os tripanozomos e os hemosporidios.

Estes fatos e outros que não referimos, interpretados em demoradas considerações (*Archiv. für Protistenkunde,* 1908) levaram HARTMANN a modificar a classificação de protozoarios, introduzindo na sub-classe de flejelados a nova ordem de *Binucleata.* Nesta ficam incluidos em diversas familias, os parazitos hematicos que anteriormente formaram o grande grupo dos hemosporidios e os flajelados que, antigamente, formavam a familia dos tripanozomos.

O parazito que estudamos vem trazer a essa modificação da sistematica apoio inabalavel, visto reprezentar, entre os tripanozomos tipicos e os protozoarios incluidos no genero *Plasmodium,* fórma intermediaria bem caraterizada. Nelle, realmente existem condições biolojicas, alternantes nas diversas fazes do ciclo, pertencentes aos 2 grupos de parazitos. Ao em vez da cizão binaria, encontrada na maioria de tripanozomos ou da divizão multipla irregular do *Trypanosoma lewisi* temos aqui multiplicação por esquizogonia tipica e constante, sempre constituida do mesmo numero de individuos. Este processo mais aperfeiçoado de multiplicação se relaciona com a faze intracelular do parazito.

zeigte der hervorragende Forscher für *Haemoproteus,* dass im Organismus der Wirbeltiere ein Wechsel von intraglobulären, geissellosen Ruheformen mit frei im Plasma lebenden Flagellaten besteht. Aus einer oogamen Befruchtung von Geschlechtselementen mit typischen Halteridienformen entsteht im *Culex pipiens* ein Ookinet, dessen weitere Entwicklung zu geisseltragenden Parasiten führt. Bei *Leucocytozoon Ziemanni* erzeugte der Ookinet durch multiple Teilung Organismen von Spirochätenform mit einer derjenigen von typischen Trypanosomen vollständig gleichen Morphologie.

Sehr häufig bestritten, ohne dass ihre Unrichtigkeit bisher bestimmt erwiesen wäre, zeigten die Beobachtungen von SCHAUDINN die enge Verwandschaft zwischen den Trypanosomen und der Gruppe von Protozoen des Blutes, die bisher als, scheinbar gut umschriebene, selbständige Gruppe unter den Namen *Haemosporidien* vereinigt wurden.

Das tatsächlich Richtige in diesen Beobachtungen wurde bald durch andere Forschungen erwiesen, nach welchen intracelluläre, geisselose Protozoen in künstlichen Kulturen geisseltragende Entwicklungsstadien von *Leptomonas*-Form zeigten. So erhielt MIAJIMA in Kulturen von Piroplasmen Flagellatenformen, welche dieser Forscher für Entwicklungsstadien des Parasiten hielt. Ebenso ergibt sich aus den Untersuchungen von ROGERS, LEISHMAN und Ch. NICOLLE über *Leishmania* das Auftreten von gut charakterisierten geisseltragenden Formen.

Auf anderer Seite erwiesen die neuen cytologischen Methoden, besonders in den Arbeiten von HARTMANN und v. PROWAZEK, ein neues Charakteristikum, welches beiden Parasitengruppen, den *Haemosporidien* und *Trypanosomiden* gemein ist.

Es ist dies die Zweizahl der Kerne, welche deutlich bei den Gattungen *Trypanosoma, Crithidia, Leptomonas* und *Herpetomonas* hervortritt, bei welchen der zweite lokomotorische Kern durch den Blepharoplasten vertreten ist.

Bei den Haemosporidien finden sich manchmal denjenigen von Trypanosomen analoge Bildungen in irgend einer Phase des Entwicklungskreises, wie SCHAUDINN bei dem Mero-

Na evolução no sangue aprezenta o parazito uma primeira faze intraglobular, na qual os organismos iniciais, aflajelados, que, óra, mostram nucleo unico, achando-se nestes o blefaroplasto incorporado ao nucleo principal, óra são vistos já com dualismo nuclear. A' faze intraglobular, na qual tem logar, de regra, a formação do aparelho flajelar completo, segue-se outra de flajelados livres no plasma, na qual a morfolojia do parazito é inteiramente semelhante á dos tripanozomos. Em rezumo: processo de multiplicação por esquizogonia e parazitismo intracelular, de um lado, do outro, vida livre no plasma, com organização estrutural analoga á de qualquer especie do genero tripanozomo, constituem dois aspetos biolojicos, reunidos no mesmo parazito, que caraterizam grupos de protozoarios distanciados nas classificações anteriores — hemosporidios e tripanozomos, reunidos agóra na mesma ordem dos *Binucleata,* pela sistematica de HARTMANN.

Julgámos ainda que o processo de multiplicação por esquizogonia, com auzencia de divizão lonjitudinal binaria, aliado á faze intraglobular, deve determinar a creação de um novo genero, na familia *Trypanosomidae,* porquanto nenhum tripanozomo conhecido aprezenta, reunidos, aquellas condições biolojicas. Além de que, as grandes dimensões do blefaroplasto deste flajelado, constituem carateristica morfolojia que bem o distancia das especies conhecidas.

MESNIL e BRIMONT, para um parazito intraglobular do *Cholopus didactylus,* crearam o genero *Endotrypanum,* em virtude do aspeto morfolojico, proximo do dos tripanozomos e da vida intracelular. Não surpreenderam qualquer fórma livre do parazito e nem conhecem ontra faze de evolução. Não seria aceitavel, só pela condição de vida intraglobular comum, colocar nosso flajelado nesse genero, porquanto delle conhecemos caracteristicas biolojicas que mais autorizam a creação de genero novo. E só na hipoteze de ser verificado, para o parazito de MESNIL, uma faze flajelada livre no plasma e a multiplicação esquizogonica, deverá o genero *En-*

und Sporozoiten der Malaria und HARTMANN bei denselben und den Microgameten von *Proteosoma* feststellte. Selbst beim Fehlen jedes Geisselapparates lassen sich, nicht selten sogar bei intraglobulären Ruhezuständen, doppelte Kerne erkennen. Dies geschieht bei den Haemogregarinen (V. PROWAZEK), bei den Sporozoiten der Malaria (ED. und ET. SERGENT), bei *Lankesterella ranarum* (FRANÇA, BILLET und BRUMPT), bei *Halteridium* (BERLINER und WOODCOCK), bei *Piroplasma bigeminum* (BREINL) u. s. w. Trotzdem schien die Autonomie der Haemosporidien und ihre Abgrenzung von den zur früheren Familie der Trypanosomen gehörigen Flagellaten in biologischen Ckarakteren festbegründet; es sind dies die Vermehrung durch regelmässige Schizogonie und der beständige intracelluläre Parasitismus. Diese Charaktere stehen übrigens nach HARTMANN in einem Abhängigkeitsverhältniss, indem die Vermehrung durch Schizogonie wahrscheinlich eine Folge des Zellparasitismus ist. Es finden sich aber auch bei dieser Vermehrungsweise Annäherungen zwischen Trypanosomiden und Haemosporidien. So haben wir als eine Weiterführung der Zweiteilung des *Trypanosoma brucei* und anderer Arten die multiple Teilung des *Trypanosoma lewisi* in den inneren Organen, in Form von Rosetten, deren Individuenzahl wechselt, ebenso bei *Trypanosoma rotatorium* im peripherischen Blute einen Zerfall in vier oder mehr Individuen nach Abrundung des Organismus (unveröffentlichte Beobachtung aus dem Institute von *Manguinhos*).

Bei den Haemosporidien bedeutet die Abwesenheit eines Geisselapparates, der häufig durch den Blepharoplasten teilweise repräsentiert wird, nach der Ansicht von HARTMANN ein Reduktionsphänomen als Folge der intracellulären Lebensweise der Parasiten. In dieser Hinsicht bildet *Haemoproteus* durch den Wechsel intraglobulärer Phasen (mit Blepharoplast, aber ohne Geissel) und geisseltragender Plasmaformen einen ausgesprochenen Uebergang von *Trypanosomen* zu *Haemosporidien.*

Diese und andere, hier nicht aufgeführte Tatsachen, welche er im Archiv für Protisten-

dotrypanum ser preferido ao que adotamos para nosso parazito.

O *Endotrypanum Schaudinni* binucleado intraglobular, é, com muita lojica, considerado pelos autores como fórma intermediaria entre os tripanozomos o os hemosporidios, constituindo tambem pela morfolojia e pelo parazitismo intracelular, um poderozo argumento em favor das idéas de SCHAUDINN sobre as estreitas relações filojeneticas entre os tripanozomos e o antigo grupo de hemosporidios.

II. DIMORFISMO SEXUAL.

A existencia nos tripanozomos, de diferenciações morfolojicas, ligadas á dualidade sexual, permanece ainda, apezar de numerozas pesquizas sobre o assunto, objeto de opiniões diverjentes. Foram os trabalhos de SCHAUDINN, que dispertaram a atenção dos pesquizadores para a existencia de diferenças sexuais, no inicio do ciclo evolutivo destes flajelados no organismo do inséto transmissor. No halteridio, porém, o diferente aspeto morfolojico dos gametos, sexualmente bem caraterizados, não oferece marjem á discussão.

Nos tripanozomos, quem primeiro rejistrou a dualidade de sexos foi V. PROWAZEK no *Trypanosoma lewisi.* Aqui, no estomago do *Haematopinus spinulosus,* a morfolojia do flajelado sofre modificações notaveis, que mais acentuam o diformismo do parazito, já existente no sangue do rato, e que corresponde á dualidade de sexos. V. PROWAZEK admite 2 sexos, considerando ainda duvidoza a existencia das fórmas indiferentes. MINCHIN, em longas pesquizas sobre o *Trypanosoma gambiense,* tambem conclue pela existencia de dois aspetos morfolojicos do tripanozomo no sangue do vertebrado, verificando ainda a permanencia desse dimorfismo, na faze inicial da evolução no tubo dijestivo da *Glossina palpalis.*

Diverjentes são as concluzões de BREINL e MOORE em diversas especies de tripanozomos: *gambiense, equiperdum, lewisi.* Para esses autores, si algum fenomeno de fecundação ocorre nos tripanozomos, consistiria elle em uma ação do blefaroplasto sobre o nucleo

kunde (1908) eingehend auseinandersetzte, bewogen HARTMANN, die Klassifikation der Protozoen abzuändern, indem er in die Unterklasse der Flagellaten die neue Ordnung der *Binucleaten* einreihte. Diese umfasst in verschiedenen Familien die Blutparasiten, welche früher die grosse Gruppe der *Haemosporidien* bildeten, nebst den Flagellaten, welche früher in die Familie der *Trypanosomen* gestellt wurden.

Der hier studierte Parasit bringt für diese Modifikation der Systematik eine feste Stütze, indem er eine deutliche Uebergangsform zwischen den typischen *Trypanosomen* und dem Genus *Plasmodium* bildet. In der Tat finden sich hier in den verschiedenen Entwicklungsphasen abwechselnd biologische Zustände, welche beiden Parasitengruppen angehören. An Stelle der Zweiteilung, wie sie bei der Mehrzahl der *Trypanosomen* vorkommt und der unregelmässigen multiplen Teilung des *Trypanosoma lewisi* haben wir hier eine Vermehrung durch typische und konstante Schizogonie, bei welcher stets eine bestimmte Zahl gleichartiger Individuen gebildet wird. Diese höchste Vervollkommnung des Vermehrungsprozesses steht in Beziehung zu einer intracellulären Phase der Parasiten. Bei seiner Entwicklung im Blute zeigt derselbe zuerst eine intraglobuläre Phase von geissellosen Organismen, welche bald einen einzigen den Blepharoplast einschliessenden Kern zeigen, bald einen doppelten Kern aufweisen. Auf eine intraglobuläre Phase mit — gewöhnlich vollständigem — Geisselapparat folgt eine andere im Plasma, welche morphologisch völlig den Trypanosomen gleicht. Es bilden also auf einer Seite Vermehrung durch Schizogonie und intracellulären Parasitismus, auf der anderen freies Leben im Plasma mit einer Struktur, welche einer beliebigen Art des Genus *Trypanosoma* entspricht, bei einem und demselben Parasiten zwei biologische Erscheinungsformen, welche sonst für zwei Protozoengruppen (*Haemosporidien* und *Trypanosomen*) charakteristisch sind; diese, in früheren Klassificationen getrennt, werden jetzt durch die Einteilung von HARTMANN in derselben Ordnung der *Binucleaten* vereinigt.

principal, realizada pela imigração de parte da substancia do primeiro para o interior do segundo. Este fenomeno reprezentaria fato capital do ciclo do parazito no organismo do vertebrado.

BREINL e MOORE consideram a diversidade morfolojica dos tripanozomos no sangue como exprimindo estadios consecutivos de crecimento do flajelado, não encontrando, em qualquer das especies que estudaram, indicação alguma para a teoria do dimorfismo sexual.

Vejamos o que rezulta de nossas observações:

O dualismo morfolojico do *Schizotrypanum cruzi* aprezenta-se muito nitido em todas as fazes do ciclo, tanto no vertebrado como no inséto transmissor. São diferenças fundamentais de estrutura, especialmente acentuadas nos aspetos da cromatina do nucleo principal e do blefaroplasto, sendo inaceitavel querer fazel-as dependentes do crecimento, quando prezentes em dois organismos no mesmo estadio evolutivo. Assim é que nos merozoitos das fórmas esquizogonicas do pulmão, um dos organismos, que devemos considerar merozoito femeo mostra, desde logo, o blefaroplasto distinto do nucleo principal e neste o cariozoma muito menor que nos organismos considerados machos, nos quais, neste estadio, a substancia do blefaroplasto ainda se acha confundida com a do nucleo principal.

Nas fórmas intraglobulares e nos flajelados livres no plasma o mesmo diformismo se evidencia, espressando-se, como descrevemos, não só nas dimensões do plasma, carater secundario, mas ainda na estrutura do blefaroplasto, que num dos cazos é munido de pequeno cariozoma esferico e no outro possue cariozoma maior, ovoide quazi sempre, transversalmente colocado. Na estrutura do nucleo existe a mesma dualidade de aspeto, sendo de rejistrar a menor quantidade de substancia cromatica na fórma que consideramos femea. Os organismos jovens, cujos nucleos se aprezentam com a cromatina disposta em longa faixa lonjitudinal, bem caraterizam esse diformismo.

Ich bin, wie schon eingangs erwähnt, der Ansicht, dass die Vermehrung durch Schizogonie, bei Fehlen einer einfachen Längsteilung, in Verbindung mit der intraglobulären Entwicklungsphase die Aufstellung eines neuen Genus in der Familie *Trypanosomidae* nötig macht, da kein bekanntes *Trypanosoma* die Vereinigung dieser beiden Zustände aufweist. Ausserdem liegt in den grossen Dimensionen des Blepharoplastes dieses Flagellaten ein morphologisches Kennzeichen, welches ihn von den früher bekannten Arten trennt.

MESNIL und BRIMONT bildeten für einen intraglobulären Parasiten des *Coloepus didactylus* ein neues Genus *Endotrypanum*, auf Grund der morphologischen Aehnlichkeit mit den Trypanosomen und der intracellulären Lebensweise. Sie trafen keine freie Form des Parasiten und kennen auch keinen anderen Entwicklungszustand. Es geht vorläufig nicht an — nur wegen des gemeinsamen Kennzeichens des intraglobulären Vorkommens — unseren Flagellaten jenem Genus einzureihen, da von demselben biologische Charaktere bekannt sind, welche die Aufstellung einer neuen Gattung begründen. Nur im Falle, dass beim MESNIL'schen Parasiten eine freie geisseltragende Blutform und eine Vermehrung durch Schizogonie nachgewiesen würden, müsste das Genus *Endotrypanum* dem von mir gewählten *Schizotrypanum* vorgezogen werden.

Das *Endotrypanum schaudinni* wird als intraglobulärer *Binucleate* mit vollem Recht von den Autoren als eine Uebergangsform von *Trypanosoma* zu den *Haemosporidien* angesehen; durch seine Morphologie und seinen intracellulären Parasitismus bildet es ebenfalls einen wichtigen Beweis zu Gunsten der Ideen von SCHAUDINN über die engen phylogenetischen Beziehungen zwischen den *Trypanosomen* und der bisherigen Gruppe der *Haemosporidien*.

2. SEXUELLER DIMORPHISMUS.

Trotz mannigfacher Untersuchungen über diese Frage bildet das Vorkommen verschiedener Trypanosomenformen als Ausdruck einer sexuellen Dualität noch immer den Gegenstand divergierender Ansichten. Durch die

No organismo do *Conorhinus* a dualidade morfolojica mais notavel é encontrada nas 2 fórmas das glandulas salivares, sendo uma dellas estreita, munida de grande blefaroplasto e aprezentando nucleo longo, disposto segundo o eixo lonjitudinal do parazito; a outra, de plasma mais largo, mostra menor blefaroplasto na extremidade posterior.

Não podemos, é claro, dos fatos observados nesse parazito, tirar concluzões gerais seguramente aplicaveis ás especies do genero tripanozomo; certo, porém, os fenomenos biolojicos aqui verificados não pódem estar muito distantes dos analogos, ainda mal estudados, nos tripanozômos tipicos.

III. O Schizotrypanum cruzi no organismo do hemiptero transmissor.

As pesquizas fundamentais sobre a intervenção das moscas hematofagas, na etiolojia das tripanozomiazes dos grandes mamiferos, foram realizadas por Bruce, em memoraveis trabalhos sobre o nagana. Já antes, viajantes em certas rejiões da Africa e tambem os indijenas conheciam o efeito malefico das picadas da mosca tse-tse; coube, porém, a Bruce demonstrar experimentalmente a transmissão do parazito do nagana, *Trypanosoma brucei* pela *Glossina morsitans*.

Foi assim iniciado novo capitulo na historia dos tripanozômos e aberta a via para numerozas pesquizas sobre esse assunto, do qual pontos importantes têm escapado, até agóra, ao dezejado esclarecimento.

A transmissão do plasmodio e do proteozoma pelos culícidas indicava serem provaveis fenomenos evolutivos analogos nos tripanozomos. Desde as pesquizas de Bruce, porém, aquella opinião foi abandonada, sendo substituida pela hipoteze da transmissão do parazito ajindo os dipteros como simples veiculadores sem qualquer função biolojica especifica. A' tal concluzão levou o fato de ter Bruce verificado que a *Glossina morsitans* só era transmissora dentro das primeiras 48 óras apoz a picada contaminante; observações recentes, porém, talvez mais exatas, vieram modificar a noção adquirida.

Arbeiten von Schaudinn wurde zuerst die Aufmerksamkeit der Forscher auf das Vorkommen sexueller Unterschiede bei *Haemoproteus* zu Anfang seines Entwicklungszyclus im Darme des Ueberträgers gerichtet. Beim *Halteridium* dagegen gestattet das verschiedene morphologische Bild der Gameten, welche deutlich zwei Geschlechtern entsprechen, keine weitere Diskussion.

Unter den *Trypanosomen* wurde die Zweigeschlechtlichkeit zuerst von Prowazek bei *Trypanosoma lewisi* angegeben. Bei diesem erleidet die Gestalt des Flagellaten im Magen des *Haematopinus spinulosus* deutliche Veränderungen, durch welche der Dimorphismus, der schon beim Blutparasiten der Ratte erkennbar ist und der Zweizahl der Geschlechter entspricht, noch deutlicher wird. V. Prowazek erkennt zwei Geschlechter an, während er das Vorkommen indifferenter Formen als noch zweifelhaft ansieht. Bei seinen eingehenden Untersuchungen über *Trypanosoma gambiense* gibt Minchin ebenfalls das Vorkommen zweier verschiedener Formen des Trypanosoma im Blute zu und konstatiert auch das Fortdauern dieses Dimorphismus im Anfange der Entwicklung im Darmkanale der *Glossina palpalis*.

Dagegen kommen Breindl und Moore in Beziehung auf *Trypanosoma gambiense, equiperdum* und *lewisi* zu entgegengesetzten Schlüssen; nach ihnen können Befruchtungserscheinungen, wenn sie bei Trypanosomen vorkommen, nur in einer Einwirkung des Blepharoplasts auf den Hauptkern bestehen, welche in der Einwanderung eines Teils der Substanz des ersteren ins Innere des zweiten bestünde. Diese Erscheinung bilde einen wichtigen Akt in der Entwicklungsreihe des Trypanosoma der Wirbeltiere.

Breinl und Moore sehen in der Verschiedenheit der Bluttrypanosomen nur den Ausdruck aufeinander folgender Wachstumsphasen, indem sie bei keiner der — von ihnen studierten — Arten Anzeichen eines sexuellen Dimorphismus auffanden. — Sehen wir nun, was aus meinen Beobachtungen hervorgeht:

Der morphologische Dualismus des *Schizotrypanum cruzi* zeigt sich sehr deutlich in allen Entwicklungsphasen, sowohl beim Wir-

O descobrimento do tripanozômo da molestia do sono determinou tambem, pela maior importancia do assunto, visto tratar-se de molestia humana, numerozas investigações. Dellas vão rezultando, todos os dias, novos conhecimentos, sendo de esperar, seja brevemente rezolvido o importante problema.

Coube a BRUCE e CASTELLANI verificar experimentalmente o papel transmissor da *Glossina palpalis,* repetindo-se aqui fato similar ao da transmissão do nagana, pela *Glossina morsitans,* limitado o periodo infetante do diptero ás primeiras 48 hóras apoz a picada contaminante.

Outros fatos, especialmente a prezença de tripanozomos no organismo de glossinas recem-capturadas, cujo tubo dijestivo se aprezentava vazio de sangue, lavaram alguns pesquizadores a admitir um ciclo evolutivo do flajelado no diptero transmissor.

Foram assim as observações de KOCH a respeito do *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma gambiense* no tubo dijestivo de glossinas. Nestas KOCH distinguiu diferenciações de fórmas que julgava ligadas á diversidade de sexos. Experimentando ainda com o *Trypanosoma gambiense,* KOCH verificou estádios nas glossinas *fusca* e *tachinoides,* de 10 a 20 dias apoz a refeição contaminante.

Similares rezultados deram as pesquizas de STUHLMANN e KUDICKE sobre o *Trypanosoma brucei* na *Glossina fusca.* Para estes autores a evolução do parazito teria inicio pela multiplicação das fórmas indiferentes no intestino posterior, caminhando o tripanozomo dali para o intestino anterior, aonde teria lugar a fecundação e formação dos pequenos parazitos inoculaveis ao vertebrado. O estádio ultimo, porém, com parazitos na cavidade da tromba, só seria atinjido em 10 % das glossinas em experiencia.

Os trabalhos de MINCHIN, GRAY e TULLOCH deram rezultados muito interessantes. Verificaram na *Glossina palpalis,* estádios evolutivos do *Trypanosoma gambiense,* até o 4.º dia apoz a injestão contaminante, sendo a evolução, no *proctodœum,* pela diferenciação morfica do parazito em 2 tipos, interpretados pelos autores como sexos diferentes. Apoz

beltiere, als auch beim übertragenden Insekte. Es handelt sich um fundamentale Strukturdifferenzen, die sich besonders in der Form des Chromatins am Hauptkern und Blepharoplast aussprechen und sich nicht durch das Wachstum erklären lassen, da sie bei beiden Organismen im selben Entwicklungszustande vorkommen. So zeigt bei den Merozoiten der Schizogonieformen aus der Lunge einer derselben, den wir als weiblich ansehen, gleich zu Anfang den Blepharoplast vom Hauptkerne getrennt und in diesem ein viel kleineres Caryosom als bei den Formen, die ich für männliche halte; bei letzteren findet sich in dieser Phase die Substanz des Blepharoplasts noch mit derjenigen des Hauptkernes vereinigt. Auch bei den intraglobulären Formen und den freien Flagellaten im Plasma ist derselbe Dimorphismus deutlich erkennbar; er äussert sich, wie beschrieben, nicht nur in den mehr nebensächlichen, grösseren Verhältnissen des Plasma, sondern auch in der Struktur des Blepharoplasts, welcher in einem Falle ein kleines rundes — im anderen Falle ein grösseres, eiförmiges und fast stets quergelagertes Caryosom aufweist. Auch bei der Struktur des Kernes findet sich dieselbe Duplizität der Bildung, wobei die geringere Chromatinmenge bei einen, der als weiblich aufgefassten, Form hervorzuheben ist. Die jugendlichen Formen, deren Kerne das Chromatin in Form eines langen und längs gelagerten Bandes zeigen, lassen diesen Dimorphismus deutlich erkennen.

Im Organismus des *Conorhinus* zeigt sich die morphologische Dualität am deutlichsten bei den zwei Formen aus den Speicheldrüsen, indem die eine schmale einen grossen Blepharoplast und einen langen Kern aufweist, welcher der Längsachse des Parasiten entsprechend gelagert ist, während der andere, mit breiterem Plasmakörper am Hinterende, einen kleineren Blepharoplasten zeigt.

Ich kann natürlich aus den bei diesen Parasiten beobachteten Tatsachen keine allgemeinen Schlüsse ziehen, welche sich mit Sicherheit auf die Arten des Genus *Trypanosoma* anwenden liessen; doch können die in meinem Falle sehr deutlich beobachteten bio-

o 4.o dia, raramente depois do 5.o, os flajelados dezapareceriam do intestino, não sendo encontrados em qualquer dos orgãos da glossina. Em experiencias com *Stomoxys, Taeniorhincus* e outros dipteros, verificaram os pesquizadores fatos analogos, com mais rapido dezaparecimento dos flajelados.

Nas tentativas de transmissão os rezultados destes experimentadores não trazem ao assunto concluzões gerais decizivas. Só conseguiram infetar novos animais, fazendo-os picar pelas glossinas imediatamente apoz a injestão contaminante. MINCHIN, argumentando com as proprias observações e com as de outros pesquizadores, conclue pela existencia de ciclos evolutivos dos tripanozômos em hospedeiros especificos, não sendo a *Glossina palpalis* o transmissor natural do *Trypanosoma gambiense,* papel incumbido á *Glossina fusca,* segundo as experiencias de KOCH.

De interesse foi ainda nesses trabalhos, a verificação da prezença de 2 tripanozômos no tubo dijestivo das glossinas em liberdade, *Trypanosoma grevi* e *T. tullochi,* muitas vezes confundidos, pelos pesquizadores, com estádios evolutivos dos tripanozômos dos grandes mamiferos e do *Trypanosoma gambiense.*

As investigações referidas, indicando seguramente o papel transmissor das moscas, falavam mais em favor da simples veiculação do flajelado pelo diptero. Realmente, nas tentativas de transmissão experimental, a função infetante do inséto só era exercida num pequeno espaço de tempo apoz a picada contaminante, o que parecia indicar a auzencia do ciclo evolutivo. Outras observações, porém, vinham contradizer as que referimos, mostrando a deficiencia dos conhecimentos nellas adquiridos. De fato, das investigações de BRUMPT, LÉGER, BILLET e KEYSSELITZ rezulta o dezenvolvimento dos tripanozomos dos peixes e das rãs no organismo de hirudineos, só evoluindo certas especies de tripanozomos em determinadas sanguesugas, o que indicava a necessidade de condições biolojicas especiais.

Por outro lado, trabalhos fundamentais de SCHAUDINN sobre o *Haemoproteus* e os de v. logischen Erscheinungen nicht sehr verschieden sein von den entsprechenden, aber noch wenig erforschten, die bei typischen Trypanosomen vorkommen.

III. Das Schizotrypanum im Organismus des Conorhinus.

Die grundlegenden Forschungen über die vermittelnde Rolle blutsaugender Fliegen bei Trypanosomainfektionen wurden von BRUCE in seinen wertvollen Arbeiten über *Nagana* gemacht. Schon frühere Reisende in gewissen Gegenden Afrikas kannten ebensowohl, wie die Eingeborenen, die verderbliche Wirkung des Stiches der Tsetsefliegen, aber BRUCE zeigte zuerst durch Versuche die Uebertragung des Naganaparasiten, des *Trypanosoma brucei* durch die *Glossina morsitans.* So begann ein neues Kapitel in der Geschichte der Trypanosomen und es öffnete sich die Bahn für zahlreiche neue Untersuchungen über diesen Gegenstand; doch hat sich noch mancher wichtige Punkt der erwünschten Aufklärung entzogen. Die Entwicklungsgeschichte von *Plasmodium* und *Proteosoma* bei den Mücken deutete die Wahrscheinlichkeit ähnlicher Entwicklungsphasen bei Trypanosomen an. Doch wurde diese Ansicht seit den Arbeiten von BRUCE verlassen und durch die Annahme ersetzt, dass die Fliegen bei der Infektion rein mechanische Ueberträger darstellten. Zu diesem Schlusse führte die Beobachtung von BRUCE, dass *Glossina morsitans* nur in den ersten 48 Stunden nach ihrer Infektion (durch Stechen eines kranken Tieres) die Krankheit übertrug, was indessen nach neueren und wohl genaueren Untersuchungen nicht zutrifft.

Auch die Entdeckung des *Trypanosoma* der Schlafkrankheit führte infolge der grossen Wichtigkeit des Gegenstandes — handelte es sich doch um eine Erkrankung des Menschen — zu zahlreichen Forschungen, die täglich unsere Kenntnisse erweitern, so dass man eine baldige Lösung dieses wichtigen Problemes erwarten kann.

BRUCE und CASTELLANI war es vergönnt, die vermittelnde Rolle der *Glossina palpalis* festzustellen, wobei sich die bei der *Nagana*

PROWAZEK sobre o *Trypanosoma lewisi,* revelavam a existencia de ciclos sexuados nos dipteros transmissores.

V. PROWAZEK verificou, no estomago do *Haematopinus spinulosus,* copulação entre individuos de sexos diferentes, com a formação de ooquineto, do qual rezultaria por processos de divizão hetero-polar semelhantes aos descritos por SCHAUDINN, flajelados do tipo critidias.

Os rezultados de v. PROWAZEK foram confirmados nas investigações recentes de BALDREY (*Archiv. fur Protistenkunde,* 1909), destas rezultando mais o fato importante da transmissão do *Trypanosoma lewisi* a um rato indene, por um *Haematopinus,* cuja refeição infetante tivéra lugar 10 dias antes. Nesta verificação de BALDREY rejistra-se um fato de transmissão experimental indireta, apoz estádios evolutivos sistematicamente estudados, ficando aí excluida a veiculação mecanica do flajelado.

Concludentes tambem de um ciclo evolutivo no invertebrado são as recentes experiencias de KLEINE, que verificou a transmissão do *Trypanosoma brucei* pela *Glossina palpalis,* decorrido o prazo minimo de 10 dias, desde a injestão contaminante. Ha que assinalar, nas investigações deste pesquizador, a auzencia do poder infetante do diptero nos primeiros dias depois da picada, fato analogo ao da transmissão do plasmodio e do proteozoma, cuja evolução nos culícidas só se completa apoz determinado tempo. Nas experiencias sobre o *Trypanosoma gambiense* os rezultados de KLEINE são tambem decizivos, verificando o poder infetante das glossinas 20 dias depois de contaminadas, permanecendo infetantes indefinidamente. KLEINE acredita na existencia de faze sexual nos hospedeiros intermediarios, e descreve estádios morficos diversos do parazito, desde o intestino posterior, onde a evolução teria inicio, até as fórmas encontradas na tromba, inoculaveis nos vertebrados.

Os rezultados de E. ROUBAUD, membro da missão de estudos da molestia do sono no Congo francez, registram conhecimentos

gemachte Beobachtung wiederholte, indem die Uebertragung sich auf die ersten 24 Stunden nach der infizierenden Blutaufnahme beschränkte.

Neuere Beobachtungen — besonders das Vorkommen von Trypanosomen im Organismus frisch gefangener und kein Blut enthaltender Glossinen — führten andere Forscher zur Annahme eines Entwicklungszyklus des Flagellaten im Ueberträger. So war es bei den Beobachtungen von KOCH über das Verhalten von *Trypanosoma brucei* und *gambiense* im Verdauungstrakte der Glossinen, wobei er Formenunterschiede feststellte, welche er auf einen sexuellen Dimorphismus zurückführte. Indem er weiter mit *Trypanosoma gambiense* experimentierte, fand KOCH 10-20 Tage nach der Aufnahme infektiösen Blutes Entwicklungsstadien bei *Glossina fusca* und *tachinoides.*

STUHLMANN und KUDICKE erhielten ähnliche Resultate bei ihren Untersuchungen über das Verhalten von *Trypanosoma brucei* in der *Glossina fusca.* Nach diesen Autoren beginnt die Entwicklung durch Vermehrung der indifferenten Formen im Hinterdarme, von wo aus sie nach dem vorderen Abschnitte desselben auswandern, woselbst die Befruchtung und Bildung kleiner, auf Wirbeltiere übertragbarer Parasitenformen stattfinden soll. Doch soll das Endstadium — kleine Flagellaten im Innern des Rüssels — nur bei 10 % der benützten Glossinen erreicht werden.

Die Arbeiten von MINCHIN, GRAY und TULLOCH ergaben sehr interessante Resultate. Sie fanden nämlich bei der *Glossina palpalis* Entwicklungsstadien des *Trypanosoma gambiense* bis 4 Tage nach der Aufnahme parasitenhaltigen Blutes, wobei die Entwicklung im Proktodäum mit dem Auftreten zweier Typen begann, welche nach den Autoren verschiedenen Geschlechtern entsprechen. Nach dem vierten, oder nur selten, nach dem fünften Tage verschwanden die Flagellaten aus dem Darme der Glossinen und wurden auch nirgends in den anderen Organen gefunden. Bei Versuchen mit *Stomoxys, Taeniorhynchus* und anderen Zweiflüglern machten sie ähnliche Beobachtungen, wobei indessen die Flagellaten noch rascher verschwanden. Die

novos do mais alto interesse, chegando o autor, sobre alguns pontos do assunto, a concluzões de grande importancia.

Este autor considera 3 modalidades no mecanismo de transmissão dos tripanozomos pelas glossinas:

1. Transmissão direta, imediata, na qual as glossinas ajiriam como lancetas inoculadoras.
2. Transmissão indireta, apoz um periodo de evolução mais demorada, *sem fenomeno sexual;* caminhando nesta o flajelado do intestino posterior, séde de multiplicação ativa, para o *proctodaeum,* e para o canal da tromba.
3. Finalmente, evolução de natureza muito especial, realizada em parazitos morfolojicamente diferenciados, prezos ás paredes internas da tromba.

Nesta ultima modalidade supõe o autor a ocurencia de fenomenos de autogamia, analogos aos descritos nas amebas e em outros protozoarios; delles, porém, não encontrámos, nas descrições, demonstração convincente.

ROUBAUD considera a multiplicação ordinaria dos tripanozomos, verificada no tubo dijestivo de todas as glossinas, alimentadas em animais contaminados, como culturas do parazito, identicas ás obtidas no meio artificial de agar-sangue.

Neste ponto é interessante comparar os rezultados observados com diversas especies de tripanozômos (*brucei, gambiense, dimorphon, congolense, cazalboui,* etc.), verificando-se, assim, que o tempo de permanencia destas especies no tubo dijestivo das moscas é muito variavel, algumas das especies tendo aí pouco tempo de vida, quando outras perduram, em atividade e em multiplicação, até que dezapareçam todos os detritos da dijestão do sangue. De demoradas pesquizas conclue ROUBAUD pela auzencia de migração, das fórmas de cultura, do intestino médio para o anterior e para a tromba, não passando ellas tambem para a cavidade geral ou para qualquer outro orgam da glossina. Assim pois, não serão fórmas que possam infetar,

Uebertragungsversuche dieser Autoren gestatten keine entscheidende Schlüsse, da sie Tiere nur dann infizieren konnten, wenn sie dieselben durch Glossinen stechen liessen, welche soeben infektiöses Blut aufgenommen hatten. Gestützt auf eigene und fremde Beobachtungen schliesst MINCHIN auf das Vorkommen eines Entwicklungskreises der Trypanosomen bei specifischen Zwischenwirten. Für das *Trypanosoma gambiensi* wäre die *Glossina palpalis* nicht der natürliche Ueberträger, während diese Rolle nach den Versuchen von KOCH der *Glossina fusca* zufiele.

In diesen Arbeiten interessiert uns noch das Auffinden zweier Trypanosomen (T. GRAYI und T. TULLOCHI) im Darme frisch eingefangener Glossinen, welche von früheren Forschern häufig mit Entwicklungsstadien von *Trypanosoma gambiense* und verschiedenen Arten aus grossen Wirbeltieren verwechselt wurden.

Obgleich die besprochenen Untersuchungen die Rolle der Fliegen als Ueberträger völlig bestätigten, sprachen sie doch mehr zu gunsten einer einfachen mechanischen Uebertragung der Flagellaten. In der Tat beschränkte sich bei den Uebertragungsversuchen die Funktion der Insekten als Krankheitsvermittler auf eine kurze Frist nach dem Stechen eines infizierten Tieres, was das Bestehen eines Entwicklungszyklus auszuschliessen schien. Diesen Beobachtungen wurde jedoch durch andere widersprochen, welche die Mangelhaftigkeit jener Befunde zeigten. So ging aus den Untersuchungen von BRUMPT, LEGER, BILLET und KEYSSELITZ eine Entwicklung von Fisch- und Froschtrypanosomen im Organismus von *Hirudineen* hervor, wobei sich jede Art nur bei bestimmten Blutsaugern entwickelte, was die Notwendigkeit besonderer biologischer Bedingungen beweist. Andererseits zeigten die fundamentalen Arbeiten von SCHAUDINN über *Hämoproteus* und diejenigen von PROWAZEK über *Trypanosoma lewisi* das Vorkommen sexueller Entwicklungsreihen in den übertragenden Insekten. PROWAZEK fand im Magen von *Hämatopinus spinulosus* eine Kopulation zwischen Individuen verschiedenen Geschlechtes mit darauffolgender Bildung eines *Ookineten,* von wel-

por picada, os vertebrados sensiveis. Os aspétos destes flajelados não são semelhantes aos encontrados nas culturas do *Trypanosoma lewisi*, não se verificando os estádios em critidias; acredita o autor ser esse fato peculiar aos tripanozomos patojenicos.

Lembradas essas experiencias, no intuito de estabelecer paralelo entre ellas e os rezultados de nossos trabalhos, devemos referir ainda a opinião diverjente de alguns pesquizadores, especialmente a de NOVY e MAC NEAL, a de BREINL e MOORE, a de PATTON e a de ROSS.

NOVY e MAC NEAL contestaram os trabalhos de SCHAUDINN sobre o Hemoproteo, opinando, a principio, que se tratava de simples cultura de um tripanozomo da *Athene noctuae* no culex; mais tarde, depois da verificação, multiplas vezes repetida, de flajelados no trato intestinal de insétos, sugadores de sangue ou não, aquelles pesquizadores passaram a interpretar as fórmas flajeladas de SCHAUDINN como sendo parazitos naturais do culex, sem qualquer relação com os hemoparazitos da *Athene noctuae*.

Na infeção natural de hematofagos por flajelados das especies critidia e herpetomonas, NOVY e MAC NEAL encontram a cauza de erro em que supõem incididos outros pesquizadores, descrevendo o dezenvolvimento de tripanozomos de vertebrados no organismo dos insétos.

BREINL e MOORE julgam que o ciclo vital completo de um tripanozomo é realizado no organismo dos vertebrados. Bazea-se essa opinião na prezença de corpos de rezistencia nos orgãos de animais infetados, sendo o aparecimento dellas consecutivo a uma ação do blefaroplasto sobre o nucleo principal. Praa demonstrar ser dispensavel, na evolução dos tripanozomos, uma faze sexuada em invertebrados, lembram o cazo da durina, tripanozomiaze transmitida pelo coito.

PATTON, que tem trazido grande contribuição ao estudo de flajelados do tubo dijestivo de insétos sugadores, acredita que estes exercem, na transmissão dos tripanozomos de vertebrados, o papel simples de veículachem durch eine, der von SCHAUDINN beschriebenen ähnliche, heteropolare Kernteilung Flagellaten von *Crithidia*-typus erzeugt werden.

Die Befunde von PROWAZEK wurden bestätigt durch neuere Untersuchungen von BALDREY (Arch. für Protistenk., 1909); diese ergaben auch die wichtige Tatsache der Uebertragung des *Trypanosoma lewisi* auf normale Ratten durch Läuse, welche 10 Tage vorher infektiöses Blut gesogen hatten. Dieselben Beobachtungen erweisen auch die indirekte experimentelle Uebertragung — nach den systematisch studierten Entwicklungszuständen —, wobei eine mechanische Uebertragung des Flagellaten ausgeschlossen ist.

Auch die neueren Untersuchungen von KLEINE lassen auf einen Entwicklungszyklus beim Ueberträger schliessen; derselbe beobachtete die Uebertragung des *Trypanosoma brucei* durch die *Glossina palpalis* nach einer Minimalzeit von 10 Tagen nach der Aufnahme infektiösen Blutes. Dabei muss auch das Fehlen der Infektiosität der Fliege in den ersten Tagen hervorgehoben werden, in Uebereinstimmung mit der Uebertragung von *Plasmodium* und *Proteosoma*, zu deren vollständiger Entwicklung bei den Mücken eine bestimmte Zeit nötig ist. Auch bei den Versuchen über *Trypanosoma gambiense* waren die Ergebnisse von KLEINE entscheidend; er konstatierte die Infektiosität der Glossinen 20 Tage nach der Blutaufnahme; dieselbe erhielt sich unbeschränkte Zeit. KLEINE glaubt an das Vorkommen sexueller Phasen bei Trypanosomen in den Zwischenwirten und beschreibt verschiedene Parasitenformen, von denjenigen im Hinterdarme — wo die Entwicklung beginnen soll — bis zu den Formen, welche im Rüssel vorkommen und sich auf Wirbeltiere übertragen lassen.

Auch die Versuche von E. ROUBAUD, Mitglied einer Mission zum Studium der Schlafkrankheit im französischen Congo-Gebiete, ergaben wissenschaftliche Resultate von höchstem Interesse. Derselbe erörtert drei Modalitäten des Mechanismus bei der Uebertragung der Trypanosomen durch Glossinen: 1. Direkte, unmittelbare Uebertragung, bei welcher die Glossinen als Inokulationsinstrument die-

dores. Opinião identica é a de Ross, que verificou, nas larvas e ninfas de culícidas, flajelados do genero critidia.

Vamos concluir agóra das nossas investigações:

Experimentando com larvas creadas no laboratorio e tendo excluido a infeção hereditaria de flajelados nellas, nossos rezultados escapam a objeção de ser possivel aqui tratar-se de flajelados naturais do hemiptero. Além de que, larvas testemunhas eram alimentadas em animais normais e nellas nunca encontrámos parazitos.

As experiencias testemunhas tornaram-se necessarias, *maxime* por termos verificado a a prezença de flajelados, no intestino médio, da quazi totalidade de conorrinos, colhidos nas habitações, o que levava a crêr fossem elles parazitos naturais do inséto. Em verdade, não estamos, por emquanto, habilitado a decidir sobre esse ponto, sendo possivel que os conorrinos, transmissores do *Schizotripanum cruzi,* sejam naturalmente parazitados por flajelados do genero critidia. Para explicar a infeção da totalidade de conorrinos por flajelados, admitindo que estes reprezentem sempre estádios evolutivos do *Schizotripanum,* fôra necessario supôr outro módo de contaminação do hemiptero, talvez a infeção das larvas pelos excrementos de hemipteros já infetados (Lutz). Isso, porque a picada de vertebrados contaminados certamente não ocazionaria, com tanta constancia, infeção dos conorrinos. Verdade é que não existe diferença alguma morfolojica, entre os flajelados do tubo dijestivo das larvas infetadas no laboratorio e os dos conorrinos colhidos nas rezidencias humanas. Por outro lado, a inoculação em cobaias do material do intestino de larvas, experimentalmente contaminadas, forneceu-nos diversos rezultados positivos, falhando algumas vezes, o mesmo acontecendo aos flajelados do intestino de insétos recemcapturados. Seja como fôr, embóra devamos voltar a novas pesquizas para esclarecer amplamente a natureza dos flajelados do intestino de conorrinos em liberdade, nossas observações sobre o dezenvolvimento do *Schizotrypanum* acham-se izentas de qualquer

nen. 2. Indirekte Uebertragung nach einer längeren Entwicklungsperiode, aber ohne geschlechtliche Phase, bei welcher der Flagellat — nach aktiver Vermehrung im Hinterdarme — nach dem Vorderdarme und dem Kanale des Rüssels auswandert. 3. Endlich, eine Evolution von besonderer Art, welche sich an, der Form nach verschiedenen, Parasiten vollzieht, die den inneren Wänden des Rüssels anhaften. Bei letzterem Modus vermutet der Autor das Vorkommen von Autogamie, analog mit derjenigen, die bei Amoeben und anderen Protozoen beschrieben ist; doch fand ich in den Beschreibungen keinen überzeugenden Nachweis desselben.

Roubaud sieht in der gewöhnlichen Vermehrung der Trypanosomen, die im Darmkanal aller an infizierten Tieren ernährten Glossinen gefunden wurde, eine Kultur des Parasiten, welche mit derjenigen übereinstimmt, welche man auf Blut-Agar erhält. Dabei ist es von Interesse, die Resultate zu vergleichen, die man bei verschiedenen Arten von *Trypanosoma* (*brucei — gambiense — dimorphon — congolense — cazalboui* etc.) erhält; man konstatiert dabei, dass die Zeit der Permanenz im Darmkanale der Fliegen bei den verschiedenen Arten sehr variirt, indem einige daselbst nur kurze Zeit leben, während andere volle Aktivität und Vermehrung zeigen, bis die Reste des verdauten Blutes verschwinden. Aus lange dauernden Untersuchungen schliesst Roubaud auf das Fehlen einer Migration der Kulturformen vom Mitteldarme nach dem Vorderdarme und dem Rüssel; ebensowenig sollen sie nach der Leibeshöhle oder einem anderen Organ der Glossinen wandern. Demgemäss wären es Formen, welche nicht durch den Stich auf Wirbeltiere verimpft werden können. Die Bilder dieser Flagellaten gleichen keineswegs denjenigen in den Kulturen von *Trypanosoma lewisi*, indem hier die Crithidiaform nicht gefunden wird. Dieses Verhältniss ist nach der Meinung des Autors den krankheitserzeugenden Trypanosomen eigentümlich.

Nach Rekapitulierung dieser Versuche, zum Zweck der Vergleichung derselben mit meinen Ergebnissen, muss ich noch einige abweichende Meinungen erwähnen, besonders die-

objeção, uma vez que fôram praticadas no laboratorio em larvas aí nacidas.

Temos, em nossas experiencias, diversos rezultados pozitivos de transmissão do *Schizotrypanum cruzi* pelo conorrino, larva ou adulto, 18 ou mais dias depois da injestão contaminante. O prazo minimo, até agóra verificado, para que o inséto se torne infetante, é de 10 dias; quanto ao tempo de duração do poder infeciozo não o avaliámos ainda, sendo todavia longo, confórme rezulta de algumas experiencias. Fica, dest'arte, excluido o papel mecanico excluzivo do hemiptero, e mesmo que esse possa atuar como simples veículador na transmissão imediata do parazito, o que nunca verificámos, a função principal será de hospedeiro intermediario, no qual o flajelado passa por ciclo evolutivo, que se completa no prazo minimo de 10 dias.

No *Conorhinus*, o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta duas modalidades evolutivas bem distintas: uma dellas é constante e se observa sempre que o inséto suga vertebrado infetado, qualquer que seja. Desta o ultimo estádio é o de parazitos, com tipo de critidias, do intestino médio. As fórmas aqui encontradas são inteiramente analogas ás das culturas artificiais e as larvas, apezar de aprezentarem os parazitos no intestino, não são infetantes para outros vertebrados. Pensámos ser esse um dezenvolvimento identico ao das culturas em agar-sangue, não tendo elle nenhuma importancia na transmissão do *Schizotrypanum*. Cazo analogo é o referido nos trabalhos de ROUBAUD; no nosso cazo porém, devido ás condições anatomo-fiziolojicas especiais, os detritos da dijestão do sangue permanecem por muitos dias no intestino do conorrino sendo, por isso, longa a permanencia dos flajelados.

Não seria talvez inaceitavel a hipoteze de que esse dezenvolvimento reprezenta a multiplicação das fórmas indiferentes, admitindo com SCHAUDINN, a existencia dellas; ou será a multiplicação de fórmas femeas não fecundadas.

Verificámos muitas vezes, a auzencia de migração dos flajelados, do intestino médio

jenigen von NOVY und MAC NEAL, BREINL und MOORE, PATTON und die von ROSS.

NOVY und MAC NEAL traten den Arbeiten von SCHAUDINN über *Haemoproteus* entgegen, indem sie zuerst glaubten, dass es sich nur um die Kultur eins Trypanosoma der *Athene noctuae* in den Mücken handle; später nach vielfach wiederholtem Auffinden von Flagellaten bei blutsaugenden und anderen Insekten — glaubten diese Forscher die Flagellatenformen von SCHAUDINN als natürliche Parasiten der Mücke — ohne irgendwelche Beziehung zu den Blutparasiten des Kauzes — auffassen zu dürfen.

In einer solchen natürlichen Infektion blutsaugender Insekten durch Arten von *Crithidia* und *Herpetomonas* suchen NOVY und MAC NEAL die Ursache der Irrtümer, in welche ihrer Meinung nach andere Forscher verfielen, wenn sie die Entwicklung von Wirbeltiertrypanosomen im Organismus von Insekten beschrieben.

BREINL und MOORE glauben, dass der vollständige Entwicklungskreis eines Trypanosomas im Organismus der Wirbeltiere stattfindet. Sie stützen ihre Meinung auf das Vorkommen von Widerstandsformen in den Organen der infizierten Tiere; das Auftreten derselben sei die Folge einer Einwirkung des Blepharoplasten auf den Hauptkern (Autogamie). Sie erinnern an den Fall der Dourine, bei welcher die Trypanosomen durch Coitus übertragen werden, um zu beweisen, dass im Entwicklungskreise der Trypanosomen eine sexuelle Phase im Innern des Ueberträgers entbehrlich ist.

PATTON, der vielfache Beiträge zur Kenntnis der Flagellaten aus dem Darme von Insekten geliefert hat, glaubt, dass letztere bei der Uebertragung der Wirbeltiertrypanosomen die Rolle bloss mechanischer Ueberträger spielen. Dieselbe Meinung hat ROSS, welcher bei Larven und Nymphen von Culiciden Flagellaten des Genus *Crithidia* fand.

Ich komme nun zu den Schlüssen aus meinen eigenen Untersuchungen: Da ich mit Larven arbeitete, die im Laboratorium gezüchtet waren, auch eine erbliche Uebertragung der Flagellaten ausgeschlossen hatte, so ent-

para as partes anteriores do tubo dijestivo do inséto, examinando, logo apoz as refeições do *Conorhinus,* o conteúdo do intestino anterior. Aí não são encontradas, nesse momento, fórmas de critidias o que deveria acontecer si a infeção do vertebrado fosse determinada pela acensão, no ato da picada, dos flajelados do intestino médio até a tromba.

De acôrdo com esses fatos, os estádios de critidias, no *Conorhinus,* nenhuma significação tem para a infeção do vertebrado; reprezentam talvez, um retrocesso á condição larvaria primitiva, devido ás influencias do meio, podendo ainda servir, cazo haja infeção pelos excrementos, para manter a vida do protozoario nas gerações sucessivas de conorrinos.

Da outra modalidade de evolução, que reprezenta, a nosso vêr, o verdadeiro ciclo evolutivo do flajelado, eficaz na transferencia delle entre vertebrados, surpreendemos 4 estádios diversos: 2 no intestino anterior, reprezentados pelos organismos da Est. 12, Fig. 78-82 e pela fórma esquizogonica da Est. 12, Fig. 89, 1 na cavidade geral e o ultimo nas glandulas salivares.

Não conhecemos o determinismo do aparecimento destas fórmas; nossas experiencias, porém, mostram serem as duas primeiras observadas, com frequencia, nas larvas alimentadas em *Callithrix,* inicialmente infetados pelo hemiptero, ao passo que não conseguimos obtel-as quando experimentando com larvas infetadas em cobaias. Por outro lado, nas tentativas de transmissão pelas picadas do inséto, verificámos fatos similares, isto é, o poder infetante das larvas contaminadas nos *Callithrix* e a auzencia delle nas nutridas em cobaias, cuja infeção era produzida por inoculação de sangue.

Raciocinando sobre esses rezultados, somos levado a admitir uma condição especial do flajelado, da qual dependeria a ocurrencia do ciclo evolutivo sexuado, no organismo do inséto trsnsmissor. Para o *Schizotrypanum cruzi* aquella condição seria realizada no *Callithrix penicillata* e provavelmente no homem, gehen meine Resultate dem Einwurfe, dass es sich um natürlich bei Hemipteren vorkommende Flagellaten handle. Ausserdem wurden andere Larven zur Kontrolle an gesunden Tieren ernährt, wobei immer die Parasiten fehlten.

Kontrollexperimente waren geboten, besonders, weil ich Flagellaten im Mitteldarme fast aller in Wohnungen gefangener Conorhinen fand, was dazu verleiten könnte, sie für natürliche Parasiten des Insektes anzusehen. In der Tat kann ich zur Zeit diese Frage nicht entscheiden, da es möglich ist, dass die Conorhinen, welche das *Schizotrypanum cruzi* übertragen, natürlich mit Flagellaten des Genus *Leptomonas (Crithidia)* infiziert sind. Zur Erklärung der Infektion sämtlicher Conorhinen durch Flagellaten — vorausgesetzt, dass diese Entwicklungsformen des *Schizotrypanum* darstellen — wäre es nötig, einen anderen Infektionsmodus bei den Wanzen anzunehmen, z. B. die Infektion der Larven durch die Exkremente bereits infizierter Individuen (LUTZ). Es ist nämlich kaum anzunehmen, dass das Stechen infizierter Wirbeltiere mit solcher Regelmässigkeit die Infektion der Conorhinen herbeiführen würde. Allerdings existiert kein Unterschied zwischen den Parasiten aus dem Darme im Laboratorium infizierter Larven und solcher von Conorhinen, die in menschlichen Wohnungen gefangen wurden. Andererseits ergab mir die Einimpfung von Material aus dem Darme experimentell infizierter Larven auf Meerschweinchen, neben einigen negativen, verschiedene positive Ergebnisse und dasselbe geschah bei Flagellaten aus dem Darme frisch gefangener Wanzen. Obwohl ich nun meine Untersuchungen wiederholen muss, um die Natur der Flagellaten aus dem Darme freilebender Conorhinen vollständig aufzuklären, so sind doch meine Beobachtungen über die Entwicklung des *Schizotrypanum* vollständig einwandsfrei, da sie mit im Laboratorium gezüchteten Larven angestellt wurden.

Ich erhielt bei meinen Versuchen über die Uebertragung des *Schizotrypanum cruzi* durch *Conorhinus* im erwachsenen oder Larven-Zustande verschiedene positive Resultate ~~zeha~~ 9

sendo estes os hospedeiros capazes de infetar conorrinos que se tornariam infetantes. Devemos aqui referir as nossas ultimas observações a respeito da morfolojia do parazito no organismo das cobaias. Nas primeiras investigações realizadas em *Callithrix* e cobaias, era constante e muito evidente o dimorfismo do flajelado, confórme referimos e vem demonstrado em nossos dezenhos; actualmente, porém, talvez devido a repetidas passajens pelo organismo de cobaias, os parazitos se aprezentam, quazi sempre, com um unico aspéto morfico, não havendo agóra a primitiva evidencia do dimorfismo.

Como explicar essa mudança na morfolojia do parazito? Será uma adaptação lenta ao organismo da cobaia, rezultando daí a predominancia de uma fórma do esquizotripano, que seria a indiferente?

Devemos voltar a novas observações sobre esse fato, para dizer delle com segurança.

A influencia de certa condição dos tripanozomos, no sangue dos vertebrados, sobre a infeção dos insétos, vem admitida nos rezultados das pesquizas de KOCH. Este verificou tornarem-se infetantes as glossinas que sugavam vertebrados com pequeno numero de parazitos, ao passo que outras, alimentadas em animais com abundancia de tripanozômos, não adquiriam o poder transmissor. Assim, pois, nossa dedução, bazeada em diversas experiencias, incide na daquelle observador.

De grande importancia foi a nossa verificação de parazitos na cavidade geral e nas glandulas salivares do conorrino. Retiravamos o liquido da cavidade, amputando as pernas ou pela punção, com tubos capilares, do abdome, não podendo sofrer duvida a observação. Os insétos que aprezentavam fórmas parazitarias na cavidade geral mostraram, no intestino médio, fórmas de critidias, aí não sendo visto nenhum parazito com blefaroplasto posterior ao nucleo principal. Quanto aos flajelados das glandulas salivares, aprezentam aspéto morfolojico muito especial, diverso do verificado em todos os outros estádios da evolução. Nenhuma duvida temos que sejam aquellas as fórmas infetantes dos

oder mehr Tage nach der infektiösen Blutaufnahme. Bis jetzt sind 18 Tage der kürzeste Termin, der nach meinen Feststellungen nötig war, um dem Ueberträger die Eigenschaft der Infektiosität zu verleihen; wie lange letztere anhält, kann ich noch nicht angeben, doch beweisen mehrere Versuche eine lange Dauer derselben.

Auf diese Weise wird bei Conorhinus die Rolle des mechanischen Ueberträgers ausgeschlossen; wenn derselbe auch als einfacher Träger des Virus funktionieren könnte, was ich niemals beobachtete, so bliebe doch seine Hauptrolle diejenige des Zwischenwirtes, in welchem der Flagellat einen Entwicklungskreis durchmacht, zu dessen Vollendung ein Minimum von 18 Tagen nötig ist. Das *Schizotrypanum cruzi* zeigt beim *Conorhinus* zwei deutlich verschiedene Arten der Entwicklung; eine derselben ist konstant und wird immer beobachtet, wenn das Insekt ein infiziertes Wirbeltier beliebiger Art sticht; ihr letztes Stadium besteht in Parasiten des Mitteldarms von *Leptomonas*-typus (*Crithidia*). Die hier gefundenen Formen stimmen vollständig mit solchen aus künstlichen Kulturen überein und die Larven sind für andere Wirbeltiere nicht infektiös, obwohl sie Parasiten im Darme aufweisen. Ich halte diese Entwicklungsart für gleichwertig mit derjenigen der Blut-Agar-Kulturen und ohne Bedeutung für die Uebertragung des *Schizotrypanum*. Es ist dies ein analoger Fall mit dem oben von ROUBAUD berichteten, jedoch bleiben, wegen besonderer anatomischer und physiologischer Bedingungen, die Residuen der Blutverdauung längere Zeit im Darme des *Conorhinus*, was die lange Permanenz der Flagellaten erklärt.

Wie mir scheint, ist die Hypothese nicht ohne weiteres abzulehnen, dass diese Entwicklungsart eine Vermehrung der indifferenten Formen darstellt (wenn man mit SCHAUDINN das Vorkommen solcher annimmt); es kann sich aber auch um eine Vermehrung unbefruchteter weiblicher Formen handeln.

Das Fehlen einer Ueberwanderung der Flagellaten aus dem Mitteldarme nach den mehr nach vorne gelegenen Partien des Darmkanales habe ich oftmals festgestellt, indem

vertebrados; julgámos, porém, necessario praticar novas pesquizas para melhor esclarecimento desta faze.

O outro ponto, sobre o qual devemos insistir, é a natureza da divizão nuclear nos tripanozômos. BREINL e MOORE, uzando aliaz processos seguros de fixação e de coloração, julgam que a divizão do nucleo principal dos tripanozomos é amitozica, nunca tendo verificado os aspétos de mitoze referidos por V. PROWAZEK.

Estudando a multiplicação do parazito, no intestino do conorrino, tivémos oportunidade de referir fazes de mitoze bem evidentes. Posteriormente, no sangue periférico de uma cobaia, observámos uma figura de mitoze do nucleo principal, que rezolve, pela sua clareza, definitivamente a questão. (Est. 12, Fig. 88). Aí se observam duas placas secundarias (placas filhas) de cromozomios, situadas sobre o fuzo de substancia acromatica; no centro deste é vizivel o filamento central, em cujas extremidades se encontram os dois centriolos. Trata-se ainda, nesse cazo, de divizão precoce do nucleo, precedendo a esquizogonia no pulmão.

Rezumindo:

1.º O *Schizotrypanum cruzi* aprezenta, no organismo do conorrino, duas modalidades de dezenvolvimento, reprezentando a primeira simples cultura do parazito; a outra, provavelmente precedida de fenomenos sexuais não surpreendidos, será, talvez, o ciclo evolutivo, eficaz na transmissão entre os vertebrados.

2.º O *Conorhinus* é um verdadeiro hospede intermediario do *Schizotrypanum*, cujo ciclo é realizado num prazo minimo de ~~10~~ dias.

3.º Os flajelados, com tipo de critidias encontrados nos conorrinos em liberdade, podem reprezentar estádios culturais do *Schizotrypanum* ou serão parazitos exclusivos do inséto.

4.º A ocurrencia do ciclo evolutivo sexuado, no organismo do conorrino, depende de condição, não explicada, dos flajelados no sangue dos vertebrados.

ich bei den Conorhinen kurz nach der Nahrungsaufnahme den Vorderdarminhalt untersuchte. Man findet hier zu solcher Zeit keine *Crithidien*-formen, wie es sein müsste, wenn die Ansteckung der Wirbeltiere beim Stiche durch das Aufsteigen der Flagellaten aus dem Mitteldarme nach dem Rüssel stattfände.

In Uebereinstimmung mit diesen Tatsachen haben die *Crithidien*-stadien im Conorhinus keine Bedeutung für die Infektion des Wirbeltieres; vielleicht repräsentieren sie ein Zurückkehren zu einem phylogenetisch ursprünglichen Zustande als Folge der Einflüsse des Mediums; dabei könnten sie, wenn es eine Infektion durch Exkremente gibt, dazu dienen, das Leben der Protozoen auch in auf einander folgenden Generationen von Conorhinen zu erhalten.

Die andere Entwicklungsart vertritt meines Erachtens den eigentlichen Entwicklungszyklus des Parasiten, der bei seiner Uebertragung auf Wirbeltiere zur Geltung kommt; ich habe von demselben vier verschiedene Stadien angetroffen: zwei im Vorderdarm, nämlich die runden Formen (Taf. 12, Fig. 78—82), und die Schizogonieform (Taf. 12, Fig. 89), ferner eine aus der Körperhöhle und die letzte aus den Speicheldrüsen.

Die veranlassenden Umstände des Auftretens dieser Formen kenne ich noch nicht, doch zeigen meine Versuche die Häufigkeit des Vorkommens der beiden ersten bei Larven, welche an — ursprünglich durch Wanzen infizierten — *Callithrix*-affen gefüttert wurden. Dagegen konnte ich sie nicht erhalten, wenn ich mit an Meerschweinchen infizierten Larven experimentierte. Andererseits beobachtete ich ähnliche Verhältnisse bei Versuchen durch den Stich der Conorhinen, nämlich die Infektiosität der Larven, welche durch die Aeffchen infiziert waren und das Fehlen einer solchen bei Larven, welche an — durch Blutinjektion infizierten — Meerschweinchen genährt wurden.

Beim Ueberlegen dieser Ergebnisse sehe ich mich veranlasst, einen besonderen Zustand der Flagellaten anzunehmen, von dem das Auftreten eines geschlechtlichen Entwicklungszyklus im Organismus des Ueberträgers ab-

Ao terminar, cumprimos o grato dever de afirmar o maior reconhecimento ao nosso mestre e Diretor Dr. GONÇALVES CRUZ, a cuja orientação devemos o rezultado destas pesquizas. Somos ainda profundamente grato aos nossos mestres, Professores S. VON PROWAZEK e M. HARTMANN, de quem recebemos os melhores ensinamentos para concluzão deste trabalho. Tambem somos em extremo obrigado ao Dr. ADOLPHO LUTZ, cujo auxilio nos foi do mais alto proveito.

Tivemos sempre, como esforçado companheiro de trabalho na zona infestada pela nova especie morbida, o Dr. BELISARIO PENNA, a quem devemos os inestimaveis proveitos de um auxilio eficaz.

hängt. Für das *Schizotrypanum cruzi* fände sich dieser Zustand bei *Callithrix penicillata* und wahrscheinlich beim Menschen; sind doch diese die Wirte, welche die Conorhinen infektiös machen können.

Hier muss ich auch meine letzten Beobachtungen über die Morphologie des Parasiten im Organismus der Meerschweinchen anführen. Bei den ersten Untersuchungen, welche an *Callithrix* und Meerschweinchen vorgenommen wurden, war der Dimorphismus der Flagellaten konstant und in die Augen springend, wie aus meiner Darstellung und den Zeichnungen hervorgeht; heute dagegen — vielleicht als Folge wiederholter Meerschweinchenpassagen — zeigen die Parasiten fast immer eine einzige Form, ohne den ursprünglichen auffälligen Dimorphismus. Wie erklärt sich diese Veränderung in der Morphologie des Parasiten? Ist es eine langsame Anpassung an den Meerschweinchenorganismus, durch welche das Vorwiegen einer Form des *Schizotrypanum*, nämlich der indifferenten, zustandekommt? Um dies mit Sicherheit zu beantworten muss ich meine Beobachtungen in Hinsicht auf diese Frage wieder aufnehmen.

Der Einfluss eines bestimmten Zustandes der Trypanosomen im Blute der Wirbeltiere auf die Infektion der Insekten wird in den Resultaten der Forschungen von KOCH zugegeben. Derselbe stellte fest, dass Glossinen infektiös wurden, wenn sie Blut von Wirbeltieren mit wenig Parasiten sogen, während andere, die an Tieren mit grosser Parasitenzahl ernährt wurden, die Uebertragungsfähigkeit nicht erwarben. So stimmt meine auf andere Experimente basierte Schlussfolgerung mit der jenes Forschers überein.

Sehr wichtig war die Feststellung des Vorkommens von Parasiten in den Speicheldrüsen und dem Lacunom der Conorhinen. Ich entnahm die Flüssigkeit des letzteren durch Abschneiden der Beine oder Punktion des Abdomens mittelst Capillaren, sodass die Beobachtung einwandfrei ist. Die Wanzen, welche Parasiten des Lacunoms zeigten, boten im Mitteldarm nur *Crithidien*-formen, bei Fehlen vom Parasiten mit hinter dem Haupt-

kern liegendem Blepharoplasten. Die Flagellaten der Speicheldrüsen geben ein ganz besonderes morphologisches Bild, welches sich von allen anderen Entwicklungsstadien unterscheidet. Es ist für mich zweifellos, dass dies die für Wirbeltiere infektiösen Formen sind; doch glaube ich, dass zur vollständigen Aufklärung dieser Phase noch weitere Untersuchungen nötig sind.

Ein anderer Punkt, auf den ich eingehen muss, ist die Art der Kernteilung bei den Trypanosomen. BREINL und MOORE, welche im Uebrigen eine zuverlässige Färbungs- und Fixierungstechnik gebrauchten, glauben, dass die Teilung des Hauptkernes bei den Trypanosomen amitotisch sei, da sie niemals die von v. PROWAZEK angegebenen Mitosebilder feststellen konnten. Beim Studium der Vermehrung des Parasiten im Darme des Conorhinus hatte ich Gelegenheit, sehr deutliche Mitosestadien zu erkennen. Später beobachtete ich im peripherischen Blute eine Mitosefigur des Hauptkernes, welche durch ihre Deutlichkeit die Frage definitiv entscheidet (Taf. 12, Fig. 88). Man bemerkt bei derselben zwei sekundäre Platten von Chromosomen (Tochterplatten), welche auf einer achromatischen Spindel liegen; im Zentrum derselben erblickt man den Zentralfaden, an dessen Enden die zwei Centriolen sichtbar sind. Es handelt sich auch in diesem Falle um eine frühzeitige Mitose des Kernes, welche der Schizogonie in der Lunge vorausgeht.

Wenn ich noch einmal resummiere, so zeigt:

1. Das *Schizotrypanum cruzi* im Organismus des *Conorhinus* zwei Arten der Entwicklung, von denen die erste eine einfache Kultur des Parasiten darstellt, während die andere — wahrscheinlich durch nicht beobachtete sexuelle Vorgänge eingeleitete — vielleicht den richtigen Entwicklungszyklus zeigt, welcher bei der Uebertragung von Wirbeltier zu Wirbeltier in Tätigkeit tritt.
2. Ist der *Conorhinus* der eigentliche Zwischenwirt des *Schizotrypanum cruzi*, dessen Entwicklungskreis in einer Periode von 10 Tagen (im Minimum) abläuft.
3. Können die Flagellaten von *Crithidien*typus, welche in freilebenden Conorhinen vorkommen, Kulturstadien des *Schizotrypanum* darstellen oder ausschliessliche Insektenparasiten sein.
4. Hängt das Auftreten des sexuellen Entwicklungszyklus im Organismus der Conorhinen von noch unaufgeklärten Zuständen der Flagellaten im Blute der Wirbeltiere ab.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pflicht, unserem Direktor, Herrn Dr. GONÇALVES CRUZ meinen besten Dank auszusprechen. Seiner Leitung verdanke ich die Resultate meiner Untersuchungen.

Auch meinen Lehrern, den Herren Dr. S. von PROWAZEK und Dr. M. HARTMANN, von denen ich bei Vollendung dieser Arbeit vielfache Belehrung erhielt, bin ich sehr dankbar. Auch Herrn Dr. ADOLPH LUTZ, dessen Hilfe mir von grösstem Nutzen war, bin ich bestens verpflichtet.

In der Zone in welcher die neue Krankheitsform herrscht hatte ich beständig als Mitarbeiter Dr. BELISARIO PENNA, dem ich für seine unschätzbare Unterstützung meiner Nachforschungen verpflichtet bin.

ESTAMPA 9

ESTAMPA 9

Fig. 1. *Conorhinus megistus* BURM. transmissor de *Schizotrypanum cruzi.*
Fig. 2. Cabeça do *Conorhinus*, vista de perfil, mostrando a tromba sugadora.
Fig. 3. Ultimo segmento abdominal do ♂.
Fig. 4. Item da ♀.

Nota — Os traços entre os dezenhos 3-4 dão os tamanhos naturais dos insétos ♂ e ♀

TAFEL 9

Fig. 1. *Conorhinus megistus.* BURM. Ueberträger des *Schizotrypanum cruzi.*
Fig. 2. Kopf des *Conorhinus,* im Profil, den Saugrüssel zeigend.
Fig. 3. Letztes Abdominalsegment des ♂.
Fig. 4. Dasselbe des ♀.

Anmerkung — Die Striche zwischen den Zeichnungen 3 und 4 geben die natürliche Grösse beider Geschlechter an.

[illegible] liegendem Blepharoplasten. Die Flagellaten der Speicheldrüsen geben ein ganz besonderes morphologisches Bild, welches sich von allen anderen Entwicklungsstadien unterscheidet. Es ist für mich zweifellos, dass dies die für Wirbeltiere infektiösen Formen sind; doch glaube ich, dass zur vollständigen Aufklärung dieser Phase noch weitere Untersuchungen nötig sind.

Ein anderer Punkt, auf den ich eingehen muss, ist die Art der Kernteilung bei den Trypanosomen. BREINL und MOORE, welche im Uebrigen eine zuverlässige Färbungs- und Fixierungstechnik gebrauchten, glauben, dass die Teilung des Hauptkernes bei den Trypanosomen amitotisch sei, da sie niemals die von v. PROWAZEK angegebenen Mitosebilder feststellen konnten. Beim Studium der Vermehrung des Parasiten im Darme des Conorhinus hatte ich Gelegenheit, sehr deutliche Mitosestadien zu erkennen. Später beobachtete ich im peripherischen [illegible] Mitose- [illegible] Deutlichkeit die Frage [illegible] (Taf. 12, [illegible]). Man sieht zwei sekundäre Platten von [illegible] (Tochterplatten) [illegible] Spindel liegen; im Zentrum der [illegible] den die zwei Centriolen [illegible]. Es handelt sich auch in diesem Falle um eine frühzeitige Mitose des Kernes, welche der Schizogonie in der Lunge vorausgeht.

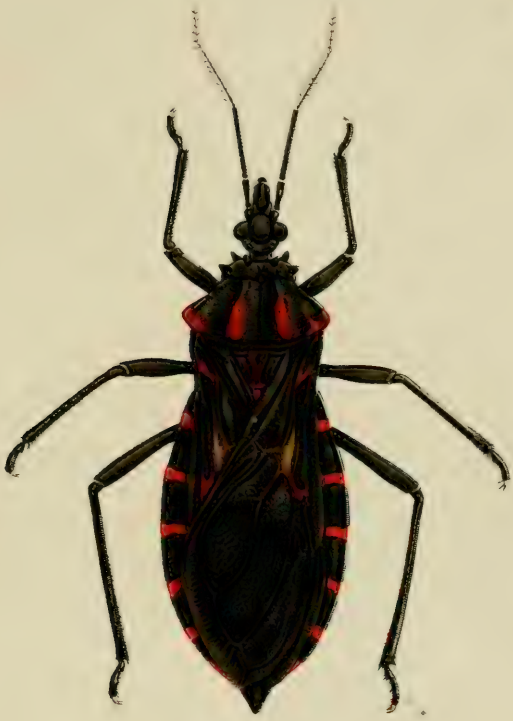
Wenn ich noch einmal resummiere, so zeigt:

1. Das *Schizotrypanum cruzi* im Organismus des *Conorhinus* zwei Arten der Entwicklung, von denen die erste eine einfache Kultur des Parasiten darstellt, während die andere — wahrscheinlich durch nicht beobachtete sexuelle Vorgänge eingeleitete — vielleicht den richtigen Entwicklungszyklus zeigt, welcher bei der Uebertragung von Wirbeltier zu Wirbeltier in Tätigkeit tritt.
2. Ist der *Conorhinus* der eigentliche Zwischenwirt des *Schizotrypanum cruzi*, dessen Entwicklungskreis in einer Periode von 10 Tagen (im Minimum) abläuft.
3. Können die Flagellaten von *Crithidien*typus, welche in freilebenden Conorhinen vorkommen, Kulturstadien des *Schizotrypanum* darstellen oder ausschliessliche Insektenparasiten sein.
4. Hängt das Auftreten des sexuellen Entwicklungszyklus im Organismus der Conorhinen von noch [illegible] Zuständen der Flagellaten im Blute der Wirbeltiere ab.

[illegible] Pflicht, [illegible] lien. Seiner Leitung [illegible] meiner Untersuchungen. [illegible] und Dr. M. HARTMANN, von denen ich bei Vollendung dieser Arbeit vielfache Belehrung erhielt, bin ich sehr dankbar. Auch Herrn Dr. ADOLPH LUTZ, dessen Hilfe mir von [illegible] war, bin ich bestens verpflichtet.

In der Zone, in welcher die neue Krankheitsform herrscht, hatte ich beständig als Mitarbeiter Dr. BELISARIO PENNA, dem ich für seine unschätzbare Unterstützung meiner Nachforschungen verpflichtet bin.

2



1

3

♂

♀

4

CASTRO SILVA
ad. nat. del.

ESTAMPA 13

Preparados do *Schizotrypanum cruzi*. Fixação á humido pelo sublimado-alcool (SCHAUDINN). Coloração pela hematoxilina ferrea (ROSENBUSCH). Oc. compens. 18. Obj. imm. homoj. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 1. *Schizotrypanum* no sangue do *Callithrix*. Divizão do cariozoma. Estrutura do blefaroplasto.
Fig. 2-4. Item. Fórmas machas.
Fig. 5-8. Fórmas femeas no sangue de cobaia. Divizão do nucleo.
Fig. 9-11-12. Fórmas do intestino médio do *Conorhinus*. Formação do flajelo.
Fig. 10. Item. Mitoze terminal do nucleo e do blefaroplasto.
Fig. 13-20. Fórmas do intestino posterior do *Conorhinus*. Estrutura nuclear do blefaroplasto. Centriolo. Corpusculo bazal.
Fig. 21-22. Fórmas do intestino médio de larva de *Conorhinus*, 21 hóras apoz ter sugado animal infetado.
Fig. 23. Fórmas de cultura em meio NOVY-MC. NEAL.
Fig. 23a-24. Primeiras modificações do *Schizotrypanum* nas culturas artificiais.
Fig. 25-29. Esquizogonia no pulmão:
Fig. 25. Merozoitos machos.
Fig. 26. Merozoitos femeos.

TAFEL 13

Schizotrypanum cruzi. Die Präparate sind feucht mit Sublimatalkohol (SCHAUDINN) fixiert und mit Eisenhämatoxylin (nach ROSENBUSCH) gefärbt. Comp. oc. 18. Obj. Oelimm. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 1. *Schizotrypanum* im Blute von *Callithrix*. Teilung des Caryosoms. Struktur des Blepharoplasts.
Fig. 2-4. Item. Männliche Formen.
Fig. 5-8. Weibliche Formen im Blute des Meerschweinchens in Kernteilung.
Fig. 9, 11, 12. Formen aus dem Mitteldarme des *Conorhinus*. Bildung der Geissel.
Fig. 10. Item. Endstadium der Mitose des Nucleus und Blepharoplasten.
Fig. 13-20. Formen aus dem Enddarme des *Conorhinus*. Kernstruktur des Blepharoplasten. Centriol. Basalkörperchen.
Fig. 21-22 — Formen aus dem Mitteldarme der *Conorhinus*larve, 21 Stunden nach Aufnahme von Blut eines inficierten Tieres.
Fig. 23. Formen aus Kulturen nach NOVY und MC-NEAL.
Fig. 23-24. Erste Veränderungen des *Schizotrypanum* in den Kulturen.
Fig. 25-29. Schizogonie. (Lunge):
Fig. 25. Männliche Merozoiten.
Fig. 26. Weibliche Merozoiten.

ESTAMPA 13

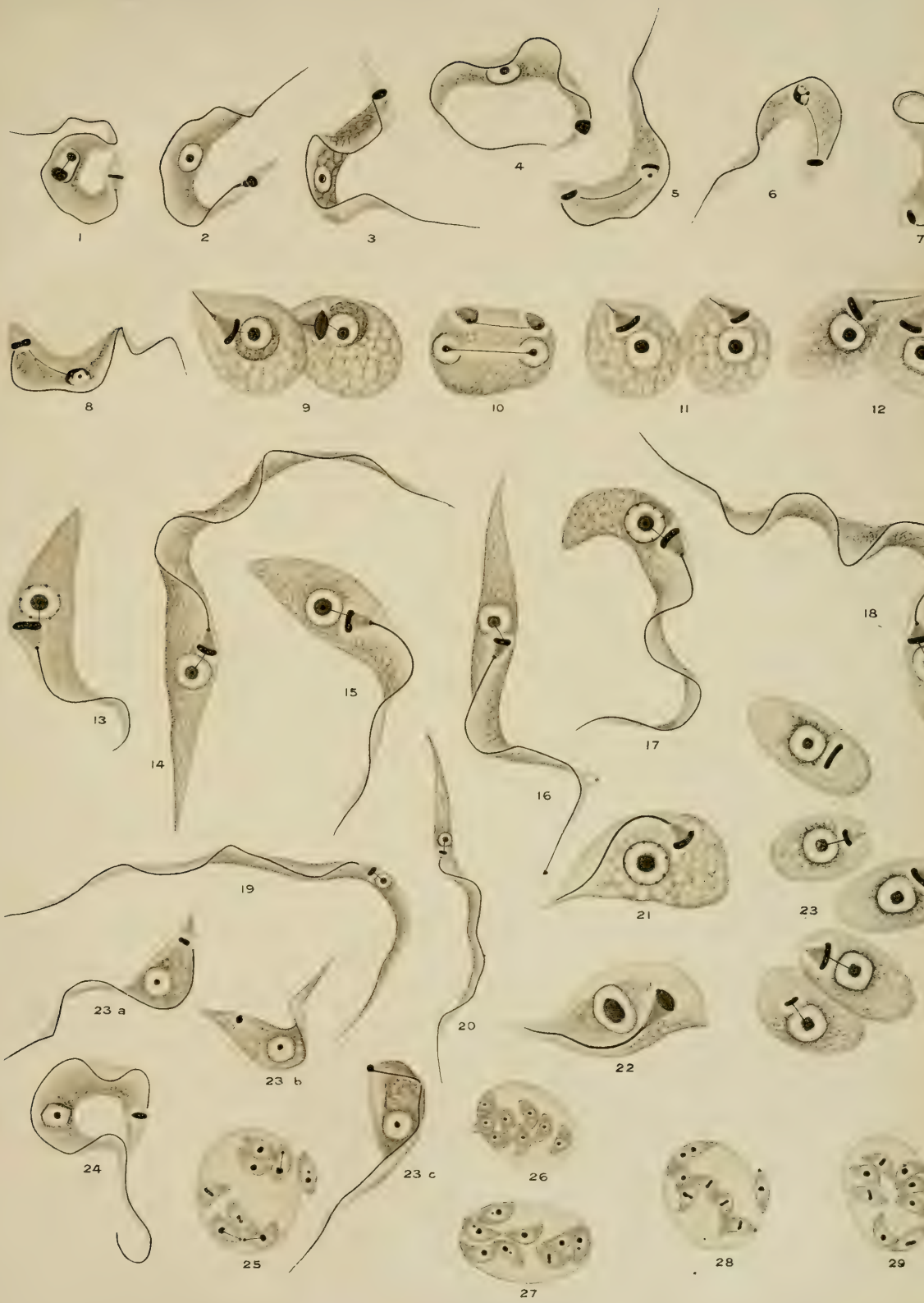
Preparados do *Schizotrypanum cruzi*. Fixação à humido pelo sublimado-alcool (SCHAUDINN). Coloração pela hematoxilina ferrea (ROSENBUSCH). Oc. compens. 18. Obj. imm. homoj. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 1. *Schizotrypanum* no sangue do *Callithrix*. Divizão do cariozoma. Estrutura do blefaroplasto.
Fig. 2-4. Item. Fórmas machas.
Fig. 5-8. Fórmas femeas no sangue de cobaia. Divizão do nucleo.
Fig. 9-11-12. Fórmas do intestino médio do *Conorhinus*. Formação do flajelo.
Fig. 10. Item. Mitoze terminal do nucleo e do blefaroplasto.
Fig. 13-20. Fórmas do intestino posterior do *Conorhinus*. Estrutura nuclear do blefaroplasto. Centriolo. Corpusculo bazal.
Fig. 21-22. Fórmas do intestino médio de larva de *Conorhinus*. 21 hóras apoz ter sugado animal infectado.
Fig. 23. Fórmas de cultura em meio Novy-Mc-Neal.
Fig. 24-26. Primeiras modificações do *Schizotrypanum* nas culturas artificiais.
Fig. 25-29. Esquizogonia no palmão.
Fig. 25. Merozoitos machos.
Fig. 26. Merozoitos femeos.

TAFEL 13

Schizotrypanum cruzi. Die Präparate sind feucht mit Sublimatalkohol (SCHAUDINN) fixiert und mit Eisenhämatoxylin (nach ROSENBUSCH) gefärbt. Comp. oc. 18. Obj. Oelimm. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 1. *Schizotrypanum* im Blute von *Callithrix*. Teilung des Caryosoms. Struktur des Blepharoplasts.
Fig. 2-4. Item. Männliche Formen.
Fig. 5-8. Weibliche Formen im Blute des Meerschweinchens in Kernteilung.
Fig. 9, 11, 12. Formen aus dem Mitteldarme des *Conorhinus*. Bildung der Geissel.
Fig. 10. Item. Endstadium der Mitose des Nucleus und Blepharoplasten.
Fig. 13-20. Formen aus dem Endstärme des *Conorhinus*. Kernstruktur des Blepharoplasten. Centriol. Basalkörperchen.
Fig. 21-22 — Formen aus dem Mitteldarme der *Conorhinuslarve*, 21 Stunden nach Aufnahme von Blut eines inficierten Tieres.
Fig. 23. Formen aus Kulturen nach Novy und Mc-Neal.
Fig. 23-24. Erste Veränderungen des *Schizotrypanum* in den Kulturen.
Fig. 25-29. Schizogonie. (Lunge):
Fig. 25. Männliche Merozoiten.
Fig. 26. Weibliche Merozoiten.



CASTRO SILVA
ad. nat. del.

ESTAMPA 11

Fig. 37-39. Fórmas iniciais da esquizogonia.
Fig. 40-46. Fórmas esquizogonicas no pulmão do vertebrado.
Fig. 47-60. Fórmas iniciais no intestino médio do *Conorhinus*.
Fig. 61-70. Fórmas de flajelados do intestino posterior do *Conorhinus*.
Fig. 71-73. Fórmas da cavidade geral do inséto.
Fig. 74-75. Fórmas das glandulas salivares.

TAFEL 11

Fig. 37-39. Anfangsformen der Schizogonie.
Fig. 40-46. Schizogonieformen aus der Lunge von Wirbeltieren.
Fig. 47-60. Initialformen aus dem Mitteldarme von *Conorhinus*.
Fig. 61-70. Flagellaten aus dem Enddarme des *Conorhinus*.
Fig. 71-73. Formen aus der Leibeshöhle des Insektes.
Fig. 74-75. Formen aus den Speicheldrüsen.

ESTAMPA 11

Fig. 37-39. Formas iniciais da esquizogonia.
Fig. 40-46. Formas esquizogonicas no pulmão do vertebrado.
Fig. 47-60. Formas iniciais no intestino médio do Camorhinus.
Fig. 61-70. Formas de fixação do intestino posterior do Camorhinus.
Fig. 71-73. Formen aus der Leibeshöhle des Insektes.
Fig. 74-75. Formen aus den Speicheldrüsen..

TAFEL 11

Fig. 37-39. Anfangsformen der Schizogonie.
Fig. 40-46. Schizogonieformen aus der Lungе von Wirbeltieren.
Fig. 47-60. Initialformen aus dem Mitteldarme von Camorhinus.
Fig. 61-70. Flagellaten aus dem Enddarme des Camorhinus.
Fig. 71-73. Formen aus der Leibeshöhle des Insektes.
Fig. 74-75. Formen aus den Speicheldrüsen..

37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75

ESTAMPA 12

Fig. 76-77. Fórmas das glandulas salivares.
Fig. 78-82. Fórmas não interpretadas do intestino médio (zigotos?).
Fig. 83-86. Mitoze do nucleo e do blefaroplasto no intestino médio.
Fig. 87. Formação do flajelo. Fórma do intestino posterior do *Conorhinus*.
Fig. 88. *Schizotrypanum* no sangue. Mitoze do nucleo.
Fig. 89-97. Fórmas encontradas no intestino médio.
Fig. 98-109. Fórmas de culturas no meio Novy e Mc. Neal.

Os dezenhos das estampas 10-11-12 foram feitos com Oc. 5. Obj. $^1/_{12}$ im. homoj. Z. de preparados fixados pelo alcool absoluto e coloridos pelo processo de Giemsa.

TAFEL 12

Fig. 76-77. Formen aus den Speicheldrüsen.
Fig. 78-82. Unbestimmte Formen aus dem Mitteldarme (Zygoten?).
Fig. 83-86. Mitose von Nucleus und Blepharoplast im Mitteldarme des *Conorhinus*.
Fig. 87. Bildung der Geissel. Formen aus dem Hinterdarme des *Conorhinus*.
Fig. 88. *Schizotrypanum* im Blute. Kernmitose.
Fig. 89-97. Formen aus dem Mitteldarme.
Fig. 98-109. Formen aus den Culturen nach Novy und Mc. Neal.

Die Zeichnungen der Tafeln 10-11-12 sind mit Oc. 5. Obj. $^1/_{12}$ Oelimm Z. nach mit absolutem Alkohol fixierten und nach Giemsa gefärbten Präparaten gezeichnet.

ESTAMPA 12

Fig. 76-77. Fórmas das glandulas salivares.
Fig. 78-82. Fórmas não interpretadas do intestino médio (zigotos?).
Fig. 83-86. Mitoze do nucleo e do blefaroplasto no intestino médio.
Fig. 87. Formação do flajelo. Fórma do intestino posterior do *Conorhinus*.
Fig. 88. *Schizotrypanum* no sangue. Mitoze do nucleo.
Fig. 89-97. Fórmas encontradas no intestino médio.
Fig. 98-109. Fórmas de culturas no meio Novy e Mc. Neal.

Os dezenhos das estampas 10-11-12 foram feitos com Oc. 5. Obj. $^1/_{12}$ im. homoj. Z. de preparados fixados pelo alcool absoluto e coloridos pelo processo de Giemsa.

TAFEL 12.

Fig. 76-77. Formen aus den Speicheldrüsen.
Fig. 78-82. Unbestimmte Formen aus dem Mitteldarme (Zygoten?).
Fig. 83-86. Mitose von Nucleus und Blepharoplast im Mitteldarme des *Conorhinus*.
Fig. 87. Bildung der Geissel. Formen aus dem Hinterdarme des *Conorhinus*.
Fig. 88. *Schizotrypanum* im Blute. Kernmitose.
Fig. 89-97. Formen aus dem Mitteldarme.
Fig. 98-109. Formen aus den Culturen nach Novy und Mc. Neal.

Die Zeichnungen der Tafeln 10-11-12 sind mit Oc. 5. Obj. $^1/_{12}$ Oelimm Z. nach mit absolutem Alkohol fixierten und nach Giemsa gefärbten Präparaten gezeichnet.

76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109

ESTAMPA 10

Fig. 1-3. Merozoitos nos globulos vermelhos.
Fig. 4. Merozoitos, mostrando a formação do blefaroplasto.
Fig. 5. Parazito totalmente incluido na hemátia, sem flajelo e membrana ondulante.
Fig. 6-19. Parazitos parcialmente incluidos.
Fig. 20. Parazito femeo livre no plasma.
Fig. 21. Parazito macho livre no plasma.
Fig. 22-24. Parazitos novos livres no plasma.
Fig. 25-26. Flajelados adultos no *Callithrix* inoculado com sangue humano.
Fig. 27-28. Parazitos do sangue humano.
Fig. 29-36. Parazitos no pulmão do vertebrado, em preparo para a esquizogonia.

TAFEL 10

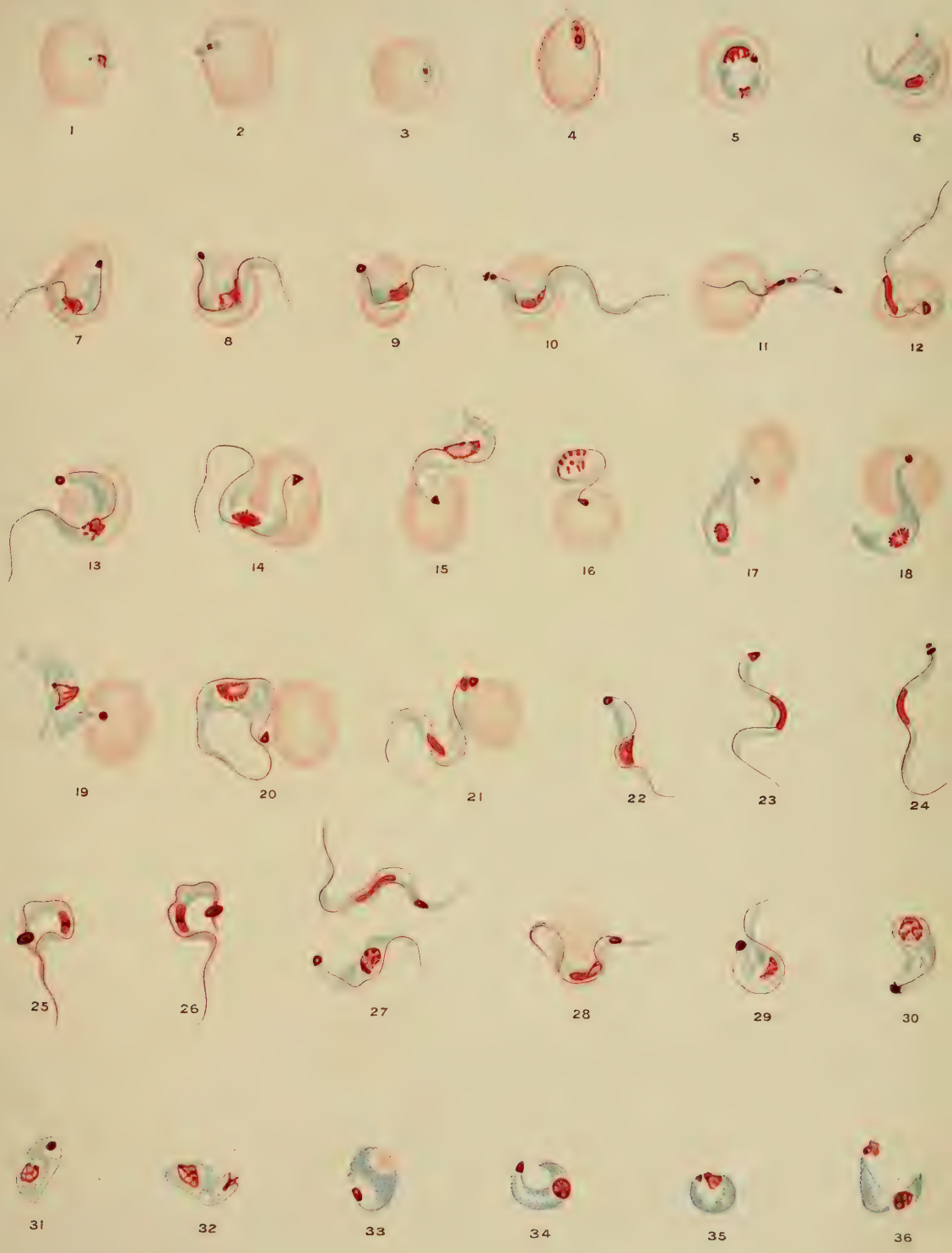
Fig. 1-3. Merozoiten in den roten Blutkörperchen.
Fig. 4. Merozoit die Bildung des Blepharoplasten zeigend.
Fig. 5. Vollständig im Blutkörperchen eingeschlossener Parasit, ohne Geissel und undulierende Membran.
Fig. 6-19. Teilweise eingeschlossene Parasiten.
Fig. 20. Weiblicher Parasit, frei im Plasma.
Fig. 21. Männlicher Parasit, frei im Plasma.
Fig. 22-24. Junge Parasiten, frei im Plasma.
Fig. 25-26. Erwachsene Parasiten der *Callithrix*, nach Impfung mit menschlichem Blute.
Fig. 27-28. Parasiten aus dem menschlichen Blute.
Fig. 29-36. Parasiten aus der Lunge von Wirbeltieren in Vorbereitung für die Schizogonie.

ESTAMPA 10

Fig. 1-3. Merozoitos nos globulos vermelhos.
Fig. 4. Merozoitos, mostrando a formação do bleiaroplasto.
Fig. 5. Parazito totalmente incluido na hematia, sem flajelo e membrana ondulante.
Fig. 6-19. Parazitos parcialmente incluidos.
Fig. 20. Parazito femeo livre no plasma.
Fig. 21. Parazito macho livre no plasma.
Fig. 22-24. Parazitos novos livres no plasma.
Fig. 25-26. Flajelados adultos no Culex inoculado com sangue humano.
Fig. 27-28. Parazitos do sangue humano.
Fig. 29-36. Parazitos no pulmão do verebrado, em preparo para a esquizogonia.

TAFEL 10

Fig. 1-3. Merozoiten in den roten Blutkörperchen.
Fig. 4. Merozoit die Bildung des Blephuroplasten zeigend.
Fig. 5. Vollständig im Blutkörperchen eingeschlossener Parasit, ohne Geissel und undulierende *Membran*.
Fig. 6-19. Teilweise eingeschlossene Parasiten.
Fig. 20. Weiblicher Parasit, frei im Plasma.
Fig. 21. Männlicher Parasit, frei im Plasma.
Fig. 22-24. Junge Parasiten, frei im Plasma.
Fig. 25-26. Erwachsene Parasiten der Culex, nach Impfung mit menschlichem Blute.
Fig. 27-28. Parasiten aus dem menschlichen Blute.
Fig. 29-36. Parasiten aus der Lunge von Wirbeltieren in Vorbereitung für die Schizogonie.



CASTRO SILVA

MEMORIAS

DO

Rio de Janeiro

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TOMO II

COM 22 ESTAMPAS E 19 FIGURAS NO TEXTO

RIO DE JANEIRO — MANGUINHOS

1910

2760-11

Gift of Prof. H. S. Jennings
Jan. 6, 1920

INDICE

FACICULO I

Paj.

Dr. MAX HARTMANN — Nova ameba intestinal, Entamoeba testudinis n. sp. (Estampa 1) 3

Dr. A. GODOY — Nova vacina contra o carbunculo sintomatico (1 figura no texto)..... 11

Dr. GOMES DE FARIA — Contribuição para a sistematica helmintolojica brazileira. II. — Dicrocoelium infidum n. sp. Parazito da vezicula biliar da Eunectes murina, L. (Estampa 2 e 1 figura no texto) 22

Dr. ARTHUR MOSES — Cazos de infeção pelo bacilo paratifico A e pelo Enteritides (Gaertner) 29

Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — Pesquizas sobre a Polytomella agiils n.g., n.sp. (com a estampa 3)..... 42

Dr. ADOLPHO LUTZ — Notas dipterolojicas..... 58

Prof. Dr. MAX HARTMANN e Dr. CARLOS CHAGAS — Estudos sobre flajellados (Estampas 4 a 9 e figs. no texto) 64

Dr. A. GODOY — Estudo quantitativo sobre a germinação dos espóros 126

Dr. ARTHUR NEIVA — Formação de raça do hematozoario do impaludismo rezistente á quinina 131

Dr. A. FONTES — Algumas considerações sobre a infeção tuberculoza e o seu respectivo virus 141

Dr. MAX HARTMANN — Ueber eine neue Darmamoebe, Entamoeba testudinis n. sp. (Hierzu Tafel I.) 3

Dr. GODOY — Un nouveau vaccin contre le charbon symptomatique (1 fig. dans le texte) 11

Dr. GOMES DE FARIA — Contribution towrds the classification of brazilian Entozoa. II. — Dicrocoelium infidum n. sp., parazite of the gall bladder of Eunectes murina, L. (With plate 2 and 1 fig.) 22

Dr. ARTHUR MOSES — Zwei Beobachtungen ueber Infectionen durch Paratyphus A und Enteritidis-Bacillen 29

Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — Untersuchungen ueber Polytomella agilis n.g., n.sp, (Hierzu Tafel 3)..... 42

Dr. ADOLPH LUTZ — Dipterologische Notizen..... 58

Prof. Dr. M. HARTMANN und Dr. CARLOS CHAGAS — Flagellaten-Studien (Hierzu Taf. 4—9 und Textfiguren)..... 64

Dr. A. GODOY — Ueber die Keimung der Sporen 126

Dr. A. NEIVA — Ueber die Bildung einer chininresistenten Rasse des Malariaparasiten.. 131

Dr. A. FONTES — Bemerkungen ueber die Tuberkulose-Infection und ihr Virus..... 141

FACICULO II

Paj.

Dr. S. VON PROWAZEK — **Contribuição para o conhecimento da fauna de protozoarios do Brazil** (Com trez figuras no texto) 149

Prof. Dr. MAX HARTMANN e Dr. CARLOS CHAGAS—**Sobre a divizão nuclear da Amoeba hyalina Dang.** (Com estampa 10) 159

Dr. CARLOS CHAGAS — **Estudos de citolojia em nova especie de coccidio, "Adelea hartmanni", do intestino do Dysdercus ruficollis L** (Com as estampas 11—15) 168

Dr. A. FONTES — **Estudos sobre tuberculoze** (Com as estampas 16 e 17) 186

Dr. ARTHUR NEIVA — **Informaçõis sobre a biolojia do Conorhinus megistos Burm** 206

Dr. ADOLPHO LUTZ — **Segunda contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Similium"** (Com as Estampas 18—21) 213

Dr. ARTHUR MOSES — **Soro antidizenterico. Metodos de dozajem** 268

Dr. GOMES DE FARIA— **Contribuição para a sistematica helmintolojica brazileira. III. Ancylostomum braziliense n. sp. Parazito dos gatos e cãis** (Com estampa 22) 286

Dr. S. VON PROWAZEK — **Beitrag zur Kenntnis der Protozoenfauna Brasiliens** (Mit 3 Figuren) 149

Prof. Dr. MAX HARTMANN und Dr. CARLOS CHAGAS — **Ueber die Kernteilung von Amoeba hyalina Dang** (Mit Taf. 10) 159

Dr. CARLOS CHAGAS — **Cytologische Studien über "Adelea hartmanni", ein neues Coccidium aus dem Darme von Dysdercus ruficollis L.** (Mit Tafeln 11 - 15). 168

Dr. A. FONTES — **Studien über Tuberkulose** (Hierzu Tafeln 16 und 17) 186

ARTHUR NEIVA — **Beiträge zur Biologie des Conorhinus megistus Burm** 206

Dr. ADOLPH LUTZ — **Zweiter Beitrag zur Kenntnis der brasilianischen Simuliumarten.** (Mit Tafeln 18—21) 213

ARTHUR MOSES — **Ueber Dysenterieserum und seine Wertbestimmung** 268

Dr. GOMES DE FARIA — **Contribution towards the classification of brazilian Entozoa. III. Ancyclostumum braziliense n. sp. Parasite of cats and dogs.** (With Plate 22) 286

TOMO II FACICULO I

MEMORIAS

DO

Rio de Janeiro

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RIO DE JANEIRO — MANGUINHOS

ABRIL DE 1910

SUMARIO:

Paj.

I — Dr. MAX HARTMANN — Nova ameba intestinal, Entamoeba testudinis, n. sp. (Estampa I) 3
II — Dr. A. GODOY — Nova vacina contra o carbunculo sintomatico (1 fig. no texto).. 11
III — Dr. GOMES DE FARIA — Contribuição para a sistematica helmintolojica brazileira. II. — Dicrocoelium infidum, n. sp. Parazito da vezicula biliar da Eunectes murina. L. 22
IV — Dr. ARTHUR MOSES — Cazos de infeção pelo bacilo paratifico A e pelo Enteritidis (Gaertner) 29
V — Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — Pesquizas sobre a Polytomella agilis n. g., n. sp. (com a estampa 3) 42
VI — Dr. ADOLPHO LUTZ — Notas dipterolojicas 58
VII — Drs. Prof. MAX HARTMANN e CARLOS CHAGAS — Estudos sobre flajelados (Estampas 4 a 9 e fig. no texto) 64
VIII — Dr. A. GODOY — Estudo quantitativo sobre a germinação dos espóros 126
IX — Dr. ARTHUR NEIVA — Formação de raça do hematozoario do impaludismo rezistente á quinina 131
X — Dr. A. FONTES — Algumas considerações sobre a infeção tuberculoza e o seu respetivo virus 141

SOMMAIRE:

I — Dr. MAX HARTMANN — Ueber eine neue Darmamoebe, Entamoeba testudinis n. sp. (Hierzu Tafel I.) 3
II — Dr. A. GODOY — Un nouveau vaccin contre le charbon symptomatique (1 fig. dans le texte) 11
III — Dr. GOMES DE FARIA — Contribution towards the classification of brazilian Entozoa
II. Dicrocoelium infidum, n. sp., parazite of the gall bladder of Eunectes murina. L. (With plate 2 and 1 fig.) 22
IV — Dr. ARTHUR MOSES — Zwei Beobachtungen ueber Infectionen durch Paratyphus- und Enteritidis-Bacillen 29
V — Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — Untersuchungen ueber Polytomella agilis n, g., n. sp. (Hierzu Tafel 3) 42
VI — Dr. ADOLPH LUTZ — Dipterologische Notizen 58
VII — Prof. Dr. M. HARTMANN und Dr. CARLOS CHAGAS — Flagellaten-Studien (Hierzu Taf. 4—9 und Textfiguren) 64
VIII — Dr. A. GODOY — Ueber die Keimung der Sporen 126
IX — Dr. A. NEIVA — Ueber die Bildung einer chininresistenten Rasse des Malariaparasiten 131
X — Dr. A. FONTES — Bemerkungen ueber die Tuberkulose-Infection und ihr Virus.. 141

AVIZO As « MEMORIAS » serão publicadas em faciculos, que não aparecerão em datas fixas e que formarão volumes de mais ou menos 200 pajinas. No minimo, aparecerá um volume por ano.

Na parte escrita em portuguez foi adotada a grafia aconselhada pela Academia de Letras do Rio de Janeiro.

Toda correspondencia relativa ás « MEMORIAS » deverá ser dirijida ao **« Diretor do Instituto Oswaldo Cruz — Caixa postal 926 — Manguinhos — Rio de Janeiro »**. Endereço telegrafico: **« Manguinhos »**.

AVIS Les « MEMOIRES » seront publiés par fascicules qui ne paraitront pas en époques déterminées et qui formeront des volumes d'à peu près 200 pages. Il paraitra chaque année, au moins, un volume.

La partie portugaise est écrite selon la graphie adoptée par l'Académie de Lettres de Rio de Janeiro.

Toute correspondance doit être adressée au **« Directeur de l'Institut Oswaldo Cruz — Caisse postale 926 — Manguinhos — Rio de Janeiro »**. Adresse télégraphique: **« Manguinhos »**.

Nova ameba intestinal, Entamoeba testudinis n. sp.

PELO

Dr. Max Hartmann,

Membro do Instituto de Molestias infetuozas em Berlin.

(Estampa 1.)

Ueber eine neue Darmamoebe, Entamoebe testudinis n. sp.

VON

Max Hartmann,

Mitglied des Instituts für Infektionskrankheiten in Berlin.

(Hierzu Tafel 1.)

Nas fezes de uma tartaruga importada (*Testudo graeca*) foram verificados, ao lado dos flajelados habitualmente encontrados (Trichomonas) uma ameba relativamente grande e um infuzorio.

Já pelo exame a fresco se poude verificar que se tratavam de dous organismos ainda não descritos; o infuzorio é especie nova de *Balantidium* e a ameba é verdadeira fórma parazitaria do genero *Entamoeba*. O Dr. CHAGAS empreendeu o estudo do infuzorio e eu o da ameba que passo a descrever sob o nome de « *Entamoeba testudinis* ».

Infelizmente a ameba só apareceu durante alguns dias e, assim mesmo, em pequena quantidade. Tendo nós sacrificado a tartaruga ao cabo de algumas semanas, encontrámos, tambem, a ameba nas porções superiores de intestino, reprezentada, porém, por poucos exemplares, emquanto que o infuzorio, associado a nematoideos, enchia completamente as rejiões superiores do tubo intestinal. Note-se ainda, que a tartaruga aprezentava um pouco de diarréa; era suficiente deital-a de costas para que logo defecasse.

In den Entleerungen einer importierten europäischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) fanden sich neben den regelmässig vorhandenen Flagellaten (Trichomonaden) auch eine verhältnissmässig grosse Amoebenart und ein Infusor. Schon bei der Lebenuntersuchung stellte es sich heraus, dass es sich um zwei noch nicht beschriebene Organismen handelt, und zwar bei dem Infusor um eine neue *Balantidium*-Art, bei der Amoebe um eine echte parasitäre Form der Gattung *Entamoeba*. Die genaue Untersuchung des Infusors hat Herr Dr. CHAGAS übernommen, ich die der Amoebe, die ich in Folgendem unter dem Namen *Entamoeba testudinis* beschreibe.

Leider fand sich die Amoebe nur an wenigen Tagen in den Entleerungen der Schildkröte und auch dann nur in äusserst geringer Anzahl. Als wir nach einigen Wochen die Schildkröte töteten, trafen wir die Amoebe auch in dem obersten Teil des Dickdarmes, aber auch nur in ganz wenigen Exemplaren, während das Infusor zusammen mit Nematoden den Inhalt des oberen Darmabschnittes vollkommen ausfüllten. Bemerkt sei noch, dass die

Os preparados foram obtidos do seguinte modo: tenues camadas de fezes distendidas sobre laminulas eram fixadas no estado humido pelo sublimado alcool de Schaudinn ou pelo liquido de Hermann e córadas pela hematoxilina ferrea de Heidenhain. Sejam aqui consignados os mais calorozos agradecimentos ao Dr. Chagas e ao Snr. Machado que me fizeram os preparados microscopicos.

O tamanho da *Entamoeba testudinis* varia de 50 a 70 μ; é, assim, a maior entameba até agora conhecida em vertebrados, e só excedida apenas em tamanho por uma unica fórma parazitaria, a *Entamoeba blattae*. Como adiante veremos, esta ameba reprezenta em outros pontos como que o estádio intermediario entre a especie acima referida e as amebas dos vertebrados.

No estado vivo faz lembrar muito as amebas da dizenteria humana, sobretudo a *Entamoeba tetragena*, da qual, porém, se diferencia imediatamente pelo tamanho.

Como ellas, deixa ver nitida separação do ectoplasma homojenio fortemente refrinjente com o endoplasma repleto de vacuolos. No estado de repouzo, o ectoplasma cerca regularmente o endoplasma; quando em movimento, coloca-se a um dos lados. O movimento se faz como na *Amoeba limax*, pela emissão de um só pseudopódio e a ameba corre toda para essa direção, alongando-se como uma gôta. A' parte posterior, vê-se muitas vezes apendice endoplasmico com aspeto de pequeno pseudopódio; provavelmente se trata de produtos de excreção, que, por algum tempo, ainda ficam aglomerados por liquido aglutinativo. (Fig. 1, Est. 1).

O endoplasma é alveolado e as mais das vezes repleto de bacterios englobados semi-dijeridos, de pequenos lêvedos, etc. No interior da ameba não foram vistas hemátias, assim como não se verificou a existencia de vacuolos contrateis. Em prepa-

Schildkröte anscheinend etwas an Diarrhöe litt; man brauchte sie nur auf den Rücken zu legen, um jedezeit Fäces von ihr zu erlangen.

Präparate wurden in der Weise hergestellt, dass Deckglasausstriche feucht mit Sublimatalkohol nach Schaudinn oder mit Hermann'scher Flüssigkeit fixiert und mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain gefärbt wurden. Den Herren Dr. Chagas und Machado, die die Präparate angefertigt haben, sei auch an dieser Stelle mein wärmster Dank ausgesprochen.

Die Grösse der *Entamoeba testudinis* beträgt circa 50—70 μ; sie ist mithin die grösste der bisher bei Wirbeltieren bekannten Entamoeben und wird an Grösse nur noch von einer parasitären Form, der *Entamoeba blattae* übertroffen. Wie wir noch sehen werden, nimmt sie auch in anderer Beziehung eine Art Mittelstellung ein zwischen der abweichenden letzt genannten Art und den Wirbeltieramoeben.

Im Leben erinnert sie sehr an die Dysenterie-Amoeben des Menschen, speciell die *Entamoeba tetragena*, von der sie aber durch ihre Grösse sofort unterscheidbar ist. Wie jene weist sie in der Regel eine deutliche Sonderung in ein homogen erscheinendes, stark lichtbrechendes Ectoplasma und ein mit Vakuolen etc. erfülltes Entoplasma auf. In der Ruhe umgiebt das Ectoplasma gleichmässig das letztere, bei der Bewegung befindet es sich stets an einer Seite. Die Bewegung geschieht nämlich nach Art der *Limax*-Amoeben, indem nur ein einziges Pseudopodium gebildet wird und die Amoebe als lang gestreckter Tropfen nach einer Richtung fliesst. An dem Hinterende sieht man häufig einen kleineren pseudopodiumartigen Anhang von Entoplasma; es handelt sich wahrscheinlich um Abscheidungsprodukte, die zusammen mit einer klebigen Flüssigkeit noch eine zeitlang mitgeschleppt werden (Fig. 1, Taf. 1).

Das Entoplasma ist alveolär und meist ganz von gefressenen und halbverdauten Bakterien, kleinen Hefezellen etc. erfüllt. Blutkörperchen wurden darin

rados fixados e córados é mais vizivel a estrutura alveolar, sobretudo quando existe pequeno numero de incluzões alimentares (Fig. 2, Est. 1).

O nucleo é claramente vizivel no estado vivo e comparativamente grande e as mais das vezes oval (cerca de 12,5 μ, quando esferico, ou 11,5 a 15 μ quando oval). A forma ovalar faz lembrar mais a do nucleo da *Entamoeba blattae*, contrariamente á fórma esferica das amebas dos vertebrados. E' separado do plasma por membrana nitida compacta de duplo contorno. Dentro delle, observa-se uma zona periferica de finas granulações (cromatina), depois uma zona anista clara e ao centro uma massa mais igual de fórma raramente esferica, as mais das vezes de fórma alongada sem contorno regular (cariozoma intumecido (Fig. 1, Est. 1). A estrutura total do nucleo já no estado vivo se assemelha a da *Entamoeba tetragena* (Hartmann 1908), o nucleo é apenas maior, raramente esferico, as trez camadas mais fortemente dezenvolvidas e o cariozoma irregular.

Tal semelhança com a *E. tetragena* é notavel tambem nos preparados fixados e córados. Aqui tambem puderam ser verificadas claramente as variações ciclicas do cariozoma. A maioria dos nucleos mostra as trez zonas descritas na ameba, em estado vivo (Est. 1, Fig. 2 e 3).

A zona periferica do nucleo exterior mostra numerozas granulações cromaticas numa rede de linina de estrutura alveolar; tais granulações podem ser tão grandes e tão confluentes que podem, nos preparados, ocultar toda a estrutura interna. O grande cariozoma entumecido aprezenta igualmente estrutura alveolar, encerra, porém, nesse estado pouca cromatina. No interior delle encontram-se na maioria das vezes, um ou dous centriolos (Est. 1, Fig. 3). Quando existem espalhadas no interior do nucleo diferentes granulações de cromatina do volume dos centriolos,

nicht beobachtet; ebenso auch keine kontraktilen Vakuolen. In fixierten und gefärbten Präparaten, tritt die alveoläre Struktur noch deutlicher zu Tage, besonders wenn wenig Nahrungseinschlüsse vorhanden sind (Fig. 2, Taf. 1).

Der Kern ist im Leben deutlich zu sehen, er ist verhältnismässig gross (c. 12,5 μ, wenn er kugelig, oder c. 11,5 auf 15 μ, wenn er oval ist) und meist oval. In letzterer Hinsicht erinnert er also mehr an den der *Entamoeba blattae* im Gegensatz zu den meist kugeligen Kernen der Wirbeltieramoeben. Gegen das Plasma ist er durch eine deutliche, doppelkonturierte derbe Kernmembran abgegrenzt. Innerhalb desselben beobachtet man meist eine periphere Zone von feinen Körnern (Chromatin), dann eine helle strukturlose Schicht und im Zentrum eine mehr gleiche Masse von selfen kugeliger, meist etwas lang gestreckter Form und ohne glatten Kontur (aufgeblähtes Caryosom) (Fig. 1 Taf. 1). Die ganze Struktur des Kernes gleicht mithin schon in Leben der von *Entamoeba tetragena* (Hartmann 1908); nur ist der Kern grösser, selten kugelig, die drei Schichten stärker entwickelt und das Caryosom unregelmässig.

Auch an den fixierten und gefärbten Präparaten tritt die Aehnlichkeit mit der *E. tetragena* deutlich zu Tage. Vor allem konnte dabei das Vorkommen zyklischer Veränderungen am Caryosom in ähnlich klarer Weise konstatirt werden. Die meisten Kerne zeigen die bei der lebenden Amoebe beschriebenen drei Zonen. (Taf. 1, Fig. 2 u. 3). Die periphere Aussenkernzone weist in einem wabig gebauten Lininwerk reichlich chromatische Körner auf; letztere können so gross werden und so dicht gelagert sein, dass sie an Ausstrichpräparaten alle weiteren inneren Strukturen verdecken. Das grosse aufgeblähte Caryosom ist gleichfalls wabig gebaut, enthält aber in diesem Zustand wenig Chromatin. In seinem Inneren trifft man meist ein oder zwei Centriolen (Taf. 1, Fig. 3). Wenn mehr Chromatinkörnchen von der Grösse der Centriole in ihm

torna-se dificil, sendo mesmo ás vezes impossivel reconhecel-os. Na maioria das vezes são distinguiveis das granulações de cromatina por serem cercados de zona clara, emquanto que os ultimos se acham incluidos nas paredes dos alveolos. Esta estrutura nuclear regular, com o cariozoma de fórma pouco habitual é o rezultado de variações ciclicas que se processaram neste e em virtude das quais a forma primitiva compacta e esferica se transformou no corpo alveolar atualmente descrito. O empalidecimento e a transformação alveolar do cariozoma continuam sempre e formam-se entre elle e a zona periferica, primeiramente algumas e depois muitas paredes de linina, dezaparecendo assim progressivamente a camada media clara, e o cariozoma primitivo forma na camada periferica apenas estrutura alveolar de linina (Est. 1, Fig. 5 e 6) regularmente impregnada de cromatina.

Ao mesmo tempo as finas granulações de cromatina da zona periferica se reunem, formando grandes massas que na maioria das vezes se assestam imediatamente sobre a membrana nuclear (Est. 1, Fig. 4 e 6) No centro do cariozoma primitivo formou-se, entretanto, em torno do centriolo remanecente outro cariozoma, a principio pequeno e compacto (Est. 1, Fig. 5) que de novo se cerca de delgada orla clara (Est. 1, Figs. 4 — 6). Neste novo cariozoma vê-se o centriolo nos preparados bem diferenciados (Est. 1, Figs. 4 e 6). *

Como mostram as figs. 7 e 8 da Est. 1, pelo mesmo processo podem aparecer nucleos com egual estrutura alveolar com pequeno corpusculo interno e com pequenas granulações de cromatina espalhadas. Os blócos perifericos de cromatina são neste cazo de novo dissolvidos, e é pos-

* A zona clara entre a membrana nuclear e as granulações perifericas de cromatina nas Figs. 4 e 6 da Est. 1 é, provavelmente, consequencia da fixação.

zerstreut sind, so kann die Erkennung der Centriole sehr schwierig unter Umständen auch unmöglich sein. In den meisten Fällen erkennt man sie dadurch von den Chromatinkörnern, dass sie von einem hellen Hofe umgeben sind, während letztere in den Wabenwänden lagern. Diese reguläre Kernstruktur mit dem ziemlich ungewöhnlichen Caryosom ist nun das Resultat von zyklischen Veränderungen, die sich an letzterem abgespielt haben und wodurch seine ursprüngliche kugelige und kompakte Form zu dem beschriebenen wabigen Körper geworden ist. Die Aufblähung und das Wabigwerden des Caryosoms setzt sich nun weiter fort und es bilden sich zwischen ihm und der peripheren Zone zunächst nur einige wenige, dann mehr Lininwände, die helle mittlere Schicht verschwindet dadurch allmählich und das ursprüngliche Caryosom bildet in der peripheren Schicht nun ein gleichmässiges mit Chromatin inprägniertes Lininwabenwerk (Taf. 1, Fig. 5 u. 6). Gleichzeitig haben sich auch die feinen Körner der peripheren Zone zu grösseren Chromatinbrocken zusammen geklumpt, die nun meist der Kernmembran dicht anliegen. (Taf. 1, Fig. 4—6). Im Zentrum des ursprünglichen Cariosoms hat sich inzwischen um das zurückgebliebene Centriol ein neues, erst kleines, kompaktes Caryosom (Fig. 5) gebildet, das wieder von einer schmalen hellen Zone umgeben ist (Fig. 4—6). In diesem neuen Caryosom sieht man bei guter Differenzierung deutlich das Centriol (Fig. 4 u. 6). *

Wie die Figuren 7 und 8 zeigen, können auf die geschilderte Weise auch gleichmässig wabig gebaute Kerne mit kleinem Binnenkörper und kleinen, zerstreuten Chromatinkörnen zustande kommen. Die peripheren Chromatinbrocken sind in diesem Falle wieder aufgelöst, vermutlich in gelöster Form ans Plasma abgegeben worden. In der Fig. 7 sieht man

* Die helle Zone zwischen Kernmembran und peripheren Chromatinkörnern in den Fig. 4—6 ist wohl nur eine Folge der Fixation.

sivel que seja esta lançada em dissolução no plasma. Na fig. 7 vê-se apenas num dos pólos nucleares um de tais blócos que poderia ser tomado por segundo cariozoma; o verdadeiro cariozoma, porém, delle se diferencia pelas paredes alveolares radiadas e pela zona de granulações, disposta no limite da fileira alveolar mais interna. Na fig. 8, ao lado do cariozoma, nota-se no interior da zona clara um pequeno granulo de cromatina, que delle se separa por estrangulamento. Se tem este corpusculo significação especial, nada posso dizer.

No que respeita os processos de multiplicação, nada, infelizmente, encontrei em consequencia da escasssez de material: Uma vez, apenas, achei uma figura nuclear que talvez se relacione com a divizão nuclear (Est. 1, Fig. 9). Na trama de linina regularmente alveolada existiam em 2 pólos opostos, dous cariozomas irregulares, rezultantes talvez de mitoze intranuclear do cariozoma levada a cabo, como já foi descrito por mim na *Entamoeba histolytica* (Hartmann — 1909). Seria, todavia, possivel tambem que se tratassem de duas grandes massas de cromatina (anfinucleolos) e que o cariozoma e centriolo, não fossem viziveis em consequencia da completa dissolução do primeiro.

As fórmas nucleares aqui descritas na *Entamoeba testudinis* constituem mais um exemplo, altamente instrutivo das variações ciclicas do cariozoma por mim descritas na *Entamoeba tetragena*, que, segundo nossa maneira de ver (Hartmann e v. Prowazek 1907) constituem regra geral para os cariozomas e figuras analogas (centrozomios e blefaroplastos).

Figuras nucleares inda mais complicadas encontram-se na grande ameba *Entamoeba blattae* como o demonstraram as novas pesquizas de Janicki (1909). Este autor descreveu naquella ameba um pequeno cariozoma compacto com centriolo situado na parte central alveolada do nucleo

nur an einem Kernpole noch einen solchen Brocken, der sogar als ein zweites Caryosom angesehen werden könnte; doch ist das eigentliche Caryosom an den radiär gestellten Wabenwänden und der Körnchenzone an der Grenze der innersten Wabenreihe deutlich als solches von ihm unterschieden. In Fig. 8 bemerkt man neben dem Caryosom innerhalb der hellen Zone ein kleines Chromatinkorn, das sich von ihm abschnürt. Ob ihm eine besondere Bedeutung zukommt, vermag ich nicht zu sagen.

Von Fortpflanzungsvorgängen habe ich infolge des sehr spärlichen Materials leider Nichts gefunden. Nur einmal traf ich ein Kernbild, das vielleicht mit einer Kernteilung in Beziehung steht (Fig. 9). In den gleichmässig wabigen Lininwerk lagen an den entgegengesetzten Polen zwei unregelmässige, klumpige Caryosome, vielleicht das Resultat einer intranucleär zu Ende geführten Caryosommitose, wie ich sie auch für *Entamoeba histolytica* beschrieben habe (Hartmann 1909). Immerhin wäre es auch möglich, dass nur zwei grössere Chromatinklumpen (Amphinucleolen) vorliegen und Caryosom und Centriol wegen völliger Auflösung des ersteren nicht zu beobachten sind.

Die hier beschriebenen Kernverhältnisse der *Entamoeba testudinis* sind ein weiteres, äusserst instruktives Beispiel der von mir für die *Entamoeba tetragena* beschriebenen zyklischen Veränderungen des Caryosoms, die nach unseren Anschauungen (Hartmann und v. Prowazek 1907) ganz allgemein den Caryosomen und analogen Gebilden (Centrosomen u. Blepharoplaste) zukommen. Noch kompliziertere Kernbilder finden sich bei der grossen *Entamoeba blattae*, wie die neuen Untersuchungen von Janicki (1909) zeigen. Derselbe beschrieb hierbei ein kompaktes kleines Caryosom mit Centriol in einer wabigen zentralen Kernpartie, die manchmal von einer hellen strukturlosen mittlere Zone umgeben ist. Ferner gibt er an, dass das Caryosom nicht in jedem Kern nachgewiesen werden konnte. In

que, ás vezes, é circundada de zona media clara, sem estrutura. Refere mais que o cariozoma não poude ser caraterizado em todos os nucleos. Neste cazo acontece como em nossa fig. 5 que o cariozoma sem o centriolo se transforma em massa alveolar. Si se comparam esta descrição e respetivas figuras com os dezenhos aqui reprezentados, torna-se evidente que tambem nesta ameba se processam no cariozoma modificações ciclicas analogas e produzem a complicada estrutura do nucleo.

O nucleo da *Entamoeba testudinis*, no tocante á seu aspeto total está colocado entre os da *Entamoeba tetragena* e da *E. blattae* e isto nos facilita o filiar o complicado tipo nuclear da ultima especie aos nucleos cariozomicos com nucleo exterior pouco dezenvolvido, com o que conseguimos mais ou menos a seguinte serie filojenetica: *Entamoeba muris*, *coli*, *buccalis*, *ranarum*, *histolytica*, *tetragena*, *testudinis e blattae*. No final duma monografia das entamebas, cuja primeira parte aparecerá, em breve, nos « Archiv. f. Protistenkunde » tratarei com maior minucia desse dezenvolvimento filojenetico.

As modalidades nucleares das duas ultimas especies de amebas, especialmente nos estádios em que não são mais viziveis o cariozoma e centriolo elucidam tambem aquellas fórmas nucleares dos protozoarios, que diferem do tipo habitual com cariozoma, como sejam os nucleos veziculozos sem cariozoma e os denominados nucleos em massa. Em ambos os cazos, trata-se simplesmente de nucleos cujos cariozomas se misturaram até o centriolo com o material do nucleo exterior em consequencia das variações ciclicas, e então a distinção do centriolo é dificil ou mesmo impossivel na estrutura alveolar impregnada de cromatina, como vimos tambem nas *Entamoeba testudinis* e *E. blattae*. Nos infuzorios, tambem, em que este tipo de nucleo é quazi geralmente espalhado notam-se tambem nucleos com cariozomas (*Chilodon* Enriques 1907, *Leucophrys* v. Prowazek

letzterem Falle ist es eben wie bei unserer Fig. 5 bis auf das Centriol ganz zu der wabigen Masse aufgelöst. Wenn man diese Beschreibung und seine Abbildungen mit den hier gegebenen Bildern vergleicht, so kann kein Zweifel bestehen, dass auch bei dieser Amoebe ähnliche zyklische Veränderungen sich an dem Caryosom abspielen und die komplizierte Struktur des Kernes bedingen.

Der Kern von *Entamoeba testudinis* steht eben in seiner ganzen Ausbildung etwa in der Mitte zwischen dem der *Entamoeba tetragena* und der *E. blattae* und das ermöglicht uns den komplizierten Kerntypus der letzteren Art von Caryosomkernen mit gering entwickeltem Aussenkern abzuleiten, wobei wir etwa zu folgender phylogenetischen Reihe gelangen: *Entamoeba muris*, *coli*, *buccalis*, *ranarum*, *histolytica*, *tetragena*, *testudinis* und *blattae*. Im Schlussteil einer monographischen Bearbeitung der Entamoeben, von der der erste Beitrag demnächst in dem «Archiv für Protistenkunde» erscheint, soll diese phylogenetische Entwicklung eingehender ausgeführt werden.

Die Kernverhältnisse der beiden letzten Amoebenarten, speziell die Stadien, wo scheinbar kein Caryosom und Centriol mehr vorhanden ist, werfen aber auch ein Licht auf jene Kernformen von Protozoen, die von dem gewöhnlichen Typus mit Caryosom abweichen, wie die bläschenförmigen Kerne ohne Caryosom und die sog. massigen Kerne. In beiden Fällen handelt es sich wohl einfach um Kerne, deren Caryosom sich bis auf die Centriole mit den Aussenkernmaterial, infolge der zyklischen Veränderungen gemischt haben, und das Centriol ist dann in dem mit Chromatin imprägnierten Wabenwerk nur schwer oder überhaupt nicht zu unterscheiden, wie wir das bei *Entamoeba testudinis* und *blattae* gesehen hatten. Doch kommen bei Infusorien, bei denen dieser Kerntypus fast allgemein verbreitet ist, auch Kerne mit Caryosomen vor (*Chilodon* Enriques 1907, *Leucophrys*, v. Prowazek 1909) und ich konnte bei einem kleinen

1909) e, neste, eu pude verificar, em um pequeno infuzorio d'agua doce, um centriolo. O Dr. CHAGAS publicará sobre este assunto observações muito interessantes que fez numa nova especie de *Balantidium* da tartaruga e dum novo infuzorio parazito dum caracol. Portanto, estou convencido de que todos esses tipos de nucleos se derivam, pela maneira descrita, dos simples nucleos cariozomicos, mormente porque já nestes cazos trata-se de nucleos com função vejetativa preponderante.

A *Entamoeba testudinis* é, como sobresae da descrição ácima, especie parazitaria bem carateristica que por toda sua estrutura pertence ao genero *Entamoeba* e eleva a 7 o numero de especies indubitaveis deste genero. E' exato que, ha tempo e agora mesmo nesses ultimos anos, tem sido descrito, principalmente por WALKER (1908), grande numero de amebas tidas como parazitarias, mas, na maioria dos cazos trata-se de amebas saprófitas cultivadas de fezes, dotadas de simples nucleo cariozomico, sem zona de cromatina vejetativa na periferia (Vide NAEGLER 1909). Como especies seguras de *Entamoeba* podemos apenas considerar as seguintes: 1) *Entamoeba muris* GRASSI, (WENYON descreveu-lhe as modalidades nucleares 1907); 2) *Ent. buccalis* (v. PROWAZEK 1904); 3) *Ent. coli* LOESCH em. SCHAUDINN (1904); 4) *Ent. histolytica* SCHAUDINN 1904, (WERNER 1908, HARTMANN 1909); 5) *Ent. ranarum* GRASSI, (DOBELL 1908); 6) *Ent. tetragena* VIERECK, (HARTMANN 1908); 7) *Ent. blattae* BÜTSCHLI, (v. JANICKI 1909 e 8) *E. testudinis* n. sp.

Na parte final da minha memoria acima citada sobre amebas parazitarias pretendo fazer o estudo comparativo minuciozo de todas estas fórmas indubitaveis.

Novembro de 1909.

Infusor aus Süsswasser auch ein Centriol darin wahrnehmen. Herr DR. CHAGAS wird ferner über die neue Art von *Balantidium* aus der Schildkröte und ein zweites neues parasitisches Infusor aus einer Schnecke sehr interessante Beobachtungen für diese Frage mitteilen. Hiernach bin ich überzeugt, dass alle diese Kerntypen sich in der angedeuteten Weise von einfachen Caryosomkernen ableiten lassen, zumal da es sich stets in diesen Fällen um vegetativ stark in Anspruch genommene Kerne handelt.

Die *Entamoeba testudinis* ist, wie aus der obigen Schilderung hervorgeht, eine wohl charakterisierte neue parasitische Art, die ihrem ganzen Bau nach zur Gattung *Entamoeba* gehört, und die Zahl der sicheren Arten derselben auf 7 erhöht. Wohl sind früher sowie auch in den letzten Jahren, besonders von WALKER (1908) eine grosse Anzahl von sogenannten parasitären Amoeben beschrieben worden, doch handelte es sich in den meisten Fällen nur um aus Fäces gezüchtete freilebende Amoebenarten mit einfachem Caryosomkern ohne periphere vegetative Chromatin-Zone (Vergl. hierzu NAEGLER 1909). Als sichere Arten der Gattung *Entamoeba* können bisher nur folgende gelten: 1) *Entamoeba muris* GRASSI (die Kernverhältnisse von WENYON 1907 beschrieben); 2) *Ent. buccalis* (PROWAZEK 1904); 3) *E. coli* LOESCH, em. SCHAUDINN (1904); 4) *E. histolytica* SCHAUDINN 1904 (WERNER 1908, HARTMANN 1909); 5) *E. ranarum*, GRASSI (DOBBEL 1908): 6) *E. tetragena* VIERECK (HARTMANN 1908); 7) *E. testudinis* n. sp. und *E. blattae*, BÜTSCHLI, (v. JANICKI 1909). Im Schlussteil meiner oben erwähnten Abhandlung über parasitische Amoeben gedenke ich eine genauere vergleichende Darstellung aller dieser sicheren Formen zu bringen.

November 1909.

BIBLIOGRAFIA.

DOBELL, C. C. . . . . 1909 Research on the intest. Protozoa of frogs and toads. Quarterly Journ. Microsc. Science, n. 210, p. 201.

ENRIQUES, PAOLO . . 1908 Die Conjugation u. sexuelle Differenzierung der Infusorien. Arch. f. Protistenkunde. Bd. XII, p. 213.

HARTMANN, M. . . . 1908 Eine neue Dysenterieamoebe, Entamoeba tetragena. (Viereck) syn. Entamoeba africana (Hartmann). Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene, suppl., p. 117.

HARTMANN, M. . . . 1908 Untersuch. über paras. Amoeben. I. Teil. Arch. f. Protistenkunde (in Druck).

HARTMANN, M. & PROWAZEH, S. v. 1907 Blepharoplast, Caryosom u. Centrosom. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 10, p. 306.

JANICKI, C. . . . . 1909 Ueber Kern u. Kernteilung von Entamoeba blattae, Buetschli. Biol. Centralbl. Bd. 29. No. 12, p. 381.

NAEGLER, K. . . . . 1909 Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amoeben. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 15, p. 1.

PROWAZEK, S. v. . . 1904 Entamoeba buccalis. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt, p. 42.

PROWAZEK, S. v. . . 1909 Formdimorphismus bei ciliaten Infusorien. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, fac. II, p. 105.

SCHAUDINN, F. . . . 1903 Untersuchungen über die Fortpf. einiger Rhizopoden. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt. Bd. XIX, p. 547.

SCHUBOTZ, H. . . . 1905 Beiträge zur Kenntniss der Amoeba blattae u. Amoeba proteus. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 6, p. 1.

WALKER, E. L. . . . 1908 The parasitic amoebae of the intest. tract of man and other animals. Journ. Med. Research. Vol. 17, p. 379.

WENYON, C. M. . . . 1907 Observ. on the Protozoa in the Intestine of Mice. Arch. f. Protistenkunde. Suppl. I, p. 169.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 1.

As figuras 1 e 2 estão aumentadas de cerca 900 vezes (dezenhadas com o aparelho ABBE, ao nivel da meza, com Obj. apocrom. ZEISS, 2 mm. e Oc. comp. 4). As figuras 3 a 9 estão aumentadas de cerca 1.600 vezes (Obj. apocrom. ZEISS 2 mm. e Oc. com. 8).

Fig. 1. — *Entamoeba testudinis* dezenhada do vivo.

Fig. 2. — It. fixada pelo sublimado-alcool e córada pela hematoxilina férrea de HEIDENHAIN.

Fig. 3-8.— Nucleos da ameba, em preparados fixados e córados e em que se vêm as variações ciclicas do cariozoma.

Fig. 9. — Nucleo com dous cariozomas, provavelmente estádio final de mitoze cariozomica intra-nuclear.

ERKLÄRUNG DER TAFEL 1.

Die Vergroesserung beträgt bei den Fig. 1 und 2 circa 900 mal (entworfen mit dem ABBE'schen Zeichenapparat auf dem Arbeitstisch bei ZEISS Apochr. Obj. 2mm und Comp. Oc. 4), bei den Fig. 3 bis 9 circa 1600fach (ZEISS Apochr. Obj. 2mm. und Comp. Oc. 8).

Fig 1. — *Entamoeba testudinis* nach dem Leben.

Fig. 2. — Amoebe nach mit Subl. Alk. fixierten und mit Eisenhaematoxylin nach Heidenhaim gefaerbten Praeparat.

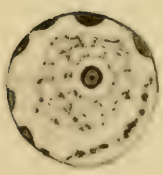
Fig. 3-8. — Kerne von Amoeben nach fixierten und gefaerbten Praeparaten, zyklische Veraenderungen am Caryosom zeigend.

Fig. 9. — Kern mit 2 Caryosomen, vermutlich Endstadium einer intranucleaeren Caryosommitose.

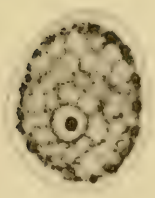
1

2

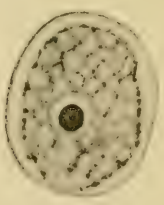
3



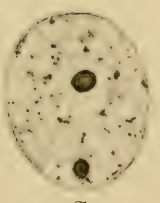
4



5

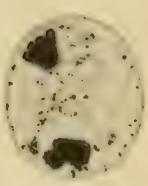


6



7

8



9

CASTRO SILVA DEL.

Nova vacina contra o carbunculo sintomatico.

PELO

Dr. A. Godoy,

Assistente.

(1 Figura no texto.)

Un nouveau vaccin contre le charbon symptomatique.

PAR LE

Dr. A. Godoy,

Assistant.

(1 Figure dans le texte.)

Os estudos sobre o carbunculo sintomatico feitos nestes ultimos decenios não alteraram de modo algum os processos de vacinação contra esta zoonoze. O processo Arloing-Cornevin (1887) continúa, quazi que unico, a ser praticado por não terem os estudos de laboratorio conseguido metodo algum capaz de substituil-o. Não faltaram, porem, tentativas como a de Leclainche e Vallée (1902) de imunizar por meio de culturas aquecidas e soro-especifico e a de Grassberger e Schattenfroh (1904) que, depois de longas e interessantes pesquizas, têm grandes acidentes com a imunização por meio das misturas de toxina-antitoxina.

Iniciámos o estudo deste assunto pelo interesse que merece, especialmente no ponto de vista economico, pois, o Estado de Minas e outros são em quazi totalidade contaminados pelo carbunculo sintomatico que nelles toma denominações diversas — peste da manqueira, quarto inchado, mal de ano, etc. O processo de vacinação com as vacinas pulverulentas havia-se mostrado aqui, como em toda parte, ou demaziado ativo e dava cazos mortais por ocazião da vacinação, ou demaziado escasso e então durante a epoca epidemica morriam alguns vitelos vacinados.

Apezar disso a perda percentual devida ás falhas acima referidas era menor

Les études sur le charbon symptomatique qui ont été faites ces dix dernières années n'ont pas changé les procédés de vaccination employés contre cette épizootie. C'est encore le procédé d'Arloing et Cornevin (1887) celui qu'on emploie le plus, et les études de laboratoire n'avaient pas abouti jusqu'à présent à une meilleure méthode. En effet, il y a eu les essais de Leclainche et Vallée (1902) d'immunisation au moyen d'inoculations de cultures chauffées et de sérum spécifique, et ceux de Grassberger et Schattenfroh (1904) avec les mélanges de toxine et antitoxine qui, employées comme méthode immunisante après de longues et intéressantes études ont été cause d'acccidents.

Nous avons entrepris des études sur ce sujet, surtout à cause du grand intérêt économique qu'il a pour nous, au Brésil, où des États, comme Minas et autres, ont presque toutes les régions contaminées par le charbon symptomatique qui y est connu sous différentes dénominations : *peste da manqueira*, *quarto inchado*, *mal de ano*, etc. Chez nous, comme ailleurs, les vaccins représentés par les poudres desséchées ont été ou trop virulents, donnant quelques cas de mort après inoculation, ou pas assez actifs et n'immunisant pas, d'une manière sûre ; on voyat alors mourir aux époques épizootiques quelques animaux vaccinés.

que a que se daria com quaisquer dos processos substitutivos até então experimentados.

A soro-vacinação, que não seria senão um recurso, é o metodo que, segundo Leclainche e Vallée, se deve preferir.

No estudo deste assunto, duas questões nos preocupamos especialmente de conhecer — o rezultado da inoculação de dozes conhecidas de suco de musculo dessecado e as propriedades das culturas obtidas com amostras que izolassemos de cazos de infeção natural que observassemos em Minas.

Os estudos feitos, referentes a estas questões, assim como a outras que a ellas se relacionam se acham expostos nos diferentes trabalhos já publicados dos Dr. Rocha Lima (1906); Dr. Gomes de Faria e o autor (1907); Dr. Gomes de Faria (1908) e do autor (1909).

As diversas porções de suco de musculo seco que obtivemos, e que haviam sido preparadas como uzualmente se faz na preparação das vacinas pulverulentas, mostraram-se aos ensaios de cultura extraordinariamente impuras. Em regra, não se saberia reconhecer a prezença do bacilo do carbunculo sintomatico nas culturas com elles feitas, mesmo apoz o previo aquecimento desses materiais. Os anaerobios obrigatorios ou facultativos, que aí se acham, subjugam de muito a este na vejetação.

A inoculação, porem, dá lezões que se assemelham ás do carbunculo sintomatico.

A dozajem do valor infeciozo dos pós virulentos por meio das culturas se nos afigurando, assim, impossivel, fizemos tentativas da sua dozajem em cobaias e em vitelos. Para demonstração dos rezultados obtidos damos a seguir o rezumo, em forma de quadro, de uma serie de inoculações em cobaias do material pulverulento orijinario do vitelo 9 (Quadro 1). Para que a doze de inoculação fosse exatamente conhecida dozavamos o reziduo seco de 2. c. c. de emulsão concentrada e livre de grumos, do material, em agua distilada. Avaliavamos então a diluição que se havia de fazer para que

En tout cas, les pertes observées avec l'emploi de ces vaccins pulvérulents étaient toujours moindres que celles qu'on aurait eu en employant un des autres procédés présentés pour les remplacer.

La sérum-vaccination, qui ne serait qu'une ressource de moment, est, selon Leclainche et Vallée la méthode de choix.

Dans nos études nous avons tâché de connaître les résultats d'inoculation de doses connues de suc musculaire desséché et virulent et les propriétés des cultures des échantillons de bacilles isolés des cas d'infection naturelle observés à Minas.

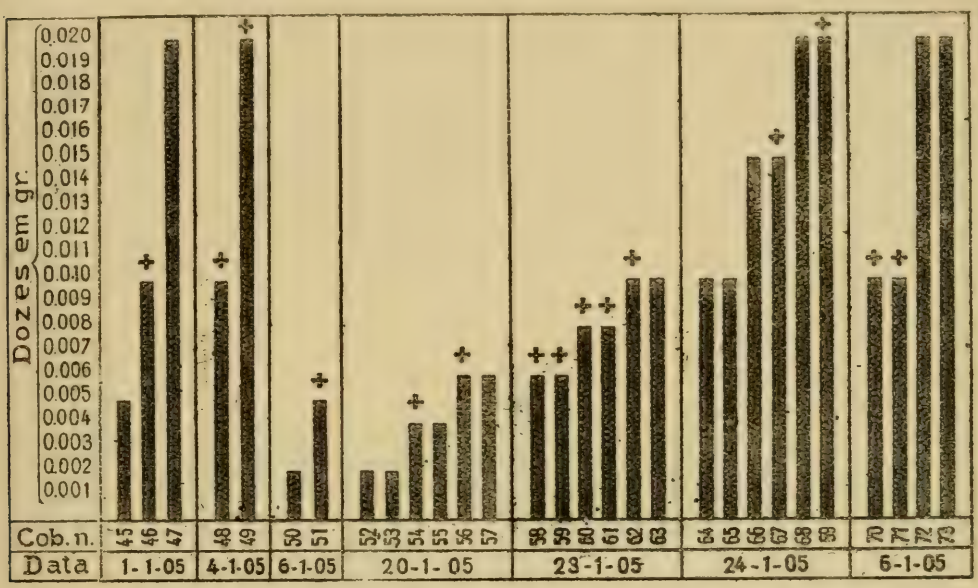
Les résultats de ces études ainsi que quelques autres, faits sur ce même sujet ont été dejà publiés par Rocha Lima (1906); Gomes de Faria et nous (1907) et par nous (1909).

Les essais de culture que nous avons fait sur les différents échantillons de suc musculaire desséché, selon la technique employée à la confection des vaccins en poudre ont montré l'extraordinaire contamination de ce matériel. En règle générale dans ces cultures on ne peut pas caractériser le bacille du charbon symptomatique, même si on avait auparavant chauffé le matériel, les anaérobes facultatifs ou obrigés empêchant la végétation du bacille du charbon bactérien. L'inoculation, cependant, du matériel produit des lésions analogues à celles du charbon symptomatique.

Ayant été ainsi démontré qu'il n'est pas possible d'avoir, au moyen du procédé des cultures une idée sur le pouvoir infectant des poudres virulentes, nous avons essayé le dosage du produit au moyen d'inoculations à des cobayes et à des veaux. Pour démontrer les résultats obtenus nous résumons au tableau 1 une série d'inoculations à des cobayes de la poudre virulente préparée avec les muscles du veau n. 9 (Tableau 1). Pour bien connaître avec exactitude la dose inoculée nous faisions une émulsion concentrée et sans grumeaux du matériel dans de l'eau distillée, et nous dosions le résidu sec de 2 cc. de cette émulsion. Avec les données ainsi obtenues nous agissions de manière à avoir dans un vo-

em 3 c. c. de injeção tivessemos a doze que dezejavamos inocular. A emulsão concentrada era conservada na geleira até o momento de se fazer a diluição.

lume de 3cc. la dose que nous voulions inoculer. L'émulsion concentrée était conservée à la glacière jusq'au moment de s'en servir pour faire les dilutions.



Quadro 1

Como se vê a morte de algumas cobaias já se dá com a inoculação de 4 miligramas, ao passo que outras rezistem a 20 miligramas, sem havermos ainda atinjido a doze seguramente mortal.

Em bóvidas o mesmo se dá.

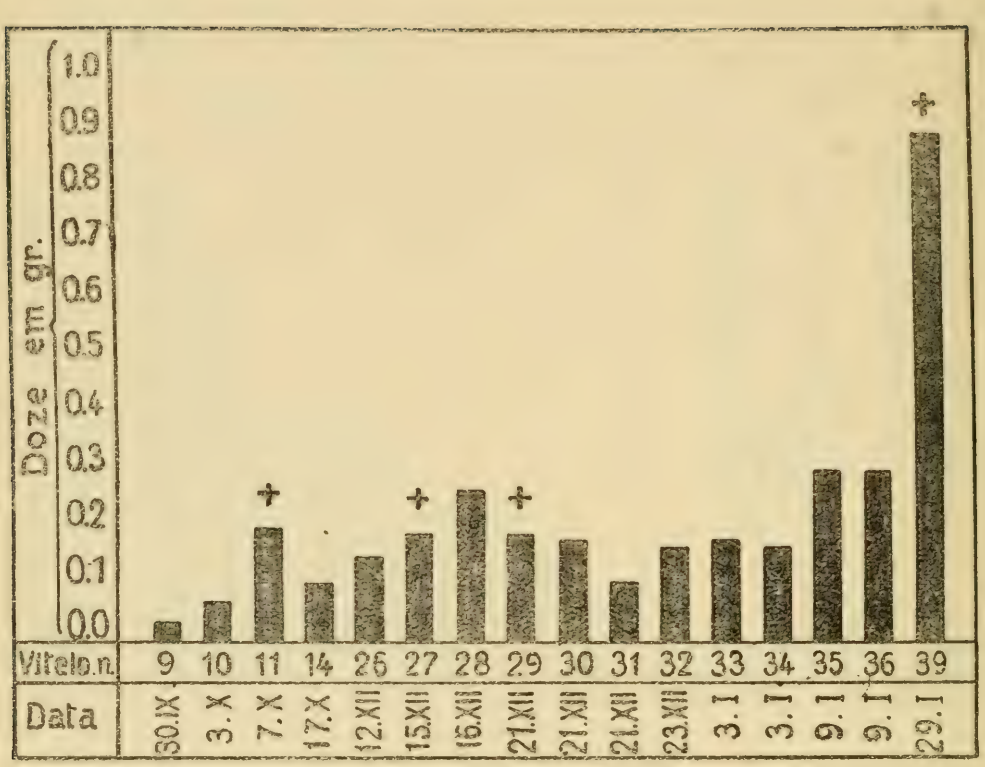
Da experiencia adiante rezumida no quadro 2 rezulta que não se póde com segurança determinar a doze minima mortal de um material infeciozo, ou, cazo isto se possa fazer ella se achará muito afastada da que já começa a ser ativa. Assim, 18 centigramas de suco de musculo do vitelo 1 mostraram-se capazes de produzir a morte quando inoculados em trez vitelos e inocuos em outros tres. Nada sofreram, porem, dois vitelos que foram inoculados com 30 centigramas.

On voit d'après ce tableau qu'il y a des cobayes qui succombent déjà avec une dose de 4 milligr., à côté d'autres qui résistent jusqu'à 20 milligr. et, encore, nous n'avons pas atteint la dose sûrement mortelle.

Chez les bovidées on constate les mêmes faits :

D'après les renseignements fournis par le tableau 2 on voit qu'on ne peut pas établir d'une manière sûre la dose minima mortelle d'un matériel infectieux, ou, quand cela est possible, cette dose se trouve encore très loin de celle qui commence à être active.

Ainsi, 18 centigr. du suc musculaire du veau n. 1 se sont montrés capables de donner la mort à trois veaux et dans les mêmes conditions n'ont rien produit sur trois autres animaux. Deus autres veaux n'ont rien souffert de l'inoculation de 30 centigr. du même matériel.



Quadro 2

Outros materiais pulverulentos empregados não se mostraram mais ativos, assim :

Material. Vitelo N.	Doze em grs.	N. do vitelo inoculado.	Rezultado.
6–7	0 1	8	não deu reação
1–40	1.0	44	it.
it.	it.	45	it.
40	0,3	42	it.
it.	1.0	43	morte em 36 h.
27–39	0.5	46	não deu reação
it.	1.0	47	it.
52	0.5	53	morte em 40 h.
53	0.5	43	it.

Não deve cauzar extranheza o fato de serem necessarias dózes tão grandes para cauzar a infeção, pois em regra os animais foram autopsiados logo apoz a morte, não havendo portanto a formação de esporos que pudessem rezistir ao dessecamento, sinão em pequena quantidade.

D'autres produits virulents ne se sont pas montrés plus actifs ; ainsi :

Matériel. Veau N.	Dose en grs.	N. du veau inoculé.	Résultat.
6–7	0.1	8	pas de réaction
1–40	1.0	44	it.
it.	it.	45	it.
40	0.3	42	it.
it.	1.0	43	mort en 36 h.
27–39	0.5	46	pas de réaction
it.	1.0	47	it.
52	0.5	53	mort en 40 h.
53	0.5	43	it.

On ne doit pas s'étonner de la grandeur des doses qu'il faut inoculer pour donner l'infection, puisque les animaux fournisseurs du matériel ont été autopsiés aussitôt après la mort et il n'y avait pas, alors, de temps suffisant que pour la formation d'un très petit nombre de spores, qui étaient les seuls à résister au desséchement.

O suco de musculo tal como se obtem antes de qualquer tratamento é muito mais ativo. De musculos recebidos de Minas obtivemos um suco que matava na doze de 1 c. c. o vitelo 2 ; o suco de musculo do vitelo 40 cauza forte reação no vitelo 42 já previamente vacinado. Porem ainda aqui se observam exceções.

As culturas puras em plena vejetação dão rezultados incertos ; porem, o mesmo não acontece com as culturas apoz o completo dezenvolvimento em que os rezultados são regulares e proporcionais á quantidade de esporos que contêm, como se vê no quadro 3.

Quadro 3

CULTURAS	MEIO EMPREGADO	N. DE ESPÓROS POR CC.	REZULTADO DE INOCULAÇÃO Á COBAIA
A	Caldo glicozado e sôro ⅓.	120	Inoculação de 3 cc. Rezistiu, sem reação local.
B	It.	24	It.
C	It.	30	It.
D	Caldo simples e sôro ⅓.	863.000	Inoculação de 3 cc. Morte em 48 h. por carbunculo tipico.
E	It.	113.000	It.
F	It.	250 000	Inoculação de 2 cc. Morte em 48 h. por carbunculo tipico.

E' de esperar que o mesmo se obtenha em vitelos, como já o indicam as inoculações que adiante referiremos.

As experiencias referidas mostram que ha maiores diferenças entre os materiais inoculados que variação na rezistencia dos animais injetados. Seriam, naturalmente, ainda maiores as diferenças de rezultados das inoculações quando se pretendesse do-

Le suc musculaire en nature avant un traitement quelconque est bien plus actif.

Nous avons obtenu avec des muscles charbonneux envoyés de Minas un suc actif qui a tué à la dose de 1cc. le veau n. 2 : le suc musculaire du veau n. 40 a produit une très forte réaction sur le veau n. 42, qui était déjà vacciné. Il y a ici encore des exceptions.

Les cultures pures en pleine période végétative fournissent des résultats très incertains, mais quand le développement est complet les résultats sont très réguliers et proportionnels à la quantité de spores qu'elles contiennent comme on peut se rendre compte d'après le Tableau 3.

Tableau 3

CULTURES	MILIEU EMPLOYÉ.	N. DE SPORES PAR CC.	RÉSULTAT DE L'INOCULATION AU COBAYE.
A	Bouillon glycosé et sèrum ⅓	120	Inoculation de 3 cc. Survie, sans réaction locale.
B	It.	24	It.
C	It.	30	It.
D	Bouillon simples et sérum ⅓	863.000	Inoculation de 3 cc. Mort en 48 h. par charbon typique.
E	It.	113.000	It.
F	It.	250.000	Inoculation de 2 cc Mort en 48 h. par charbon typique.

On peut s'attendre à ce que le mème résultat puisse être obtenu sur les veaux, comme d'ailleurs, laissent voir les résultats des inoculations que nous montrerons ci après.

Nos expériences montrent qu'il y a une plus grande différence parmi les matériaux virulents qu'il y a de variations de résistence chez les animaux inoculés.

Les différences des résultats d'inoculation seraient encore plus grandes quand on

zar materiais em que os esporos estivessem englobados por substancias tornadas insoluveis pelo calor, como na pratica da fabricação das vacinas pulverulentas. No cazo habitual dessa fabricação considera-se, em regra, como tendo os diferentes sucos de musculo o mesmo valor.

Si estas considerações vizassem de qualquer modo concluir pela dificuldade de se obter um produto vacinante, com razão se nos apontaria para as estatisticas que demonstram a eficacia deste modo de vacinação, mas, o que queremos é demonstrar que é extraordinariamente facil de se conseguir a imunidade no carbunculo sintomatico. E', de resto, prova disto o sucesso das inoculações de produtos os mais variados, de estados fizicos tão diferentes e por vias as mais diversas. Não faltam processos, porem elles são inconstantes e alguns de dificil pratica. Uma molestia de tão facil imunização não deve continuar a ser prevenida com vacinas só toleraveis no inicio da epoca bacteriolojica.

No estudo da imunização contra o carbunculo sintomatico perdeu-se completamente de vista a inoculação de germens mortos que se faz por ocazião da inoculação das diferentes vacinas onde elles são de milhares contra as centenas de esporos que ellas contem. Já Kitasato (1889) havia observado que culturas antigas e completamente inativas imunizam. Ora, nessas, dado o meio em que eram feitas, se póde concluir que estavam quazi todos os germens, que continham, mortos.

Esta ideia que é apenas sujerida como explicação para a atividade de processos tão heterojenios é amplamente demonstrada pelas inoculações das culturas vacinantes onde não se póde pensar numa imunidade obtida a custa de uma infeção benigna inicial, visto a pequenissima quantidade de esporos inoculados, dezenas, assim como por não poderem essas inoculações serem tornadas mais ativas pela adição de acido latico e outras substancias quimiotaticas

aurait à doser des matériaux dans lesquels les spores seraient englobés par des produits devenus insolubles par la chaleur, comme c'est le cas dans la pratique de la fabrication des vaccins pulvérulents. D'habitude on considère, dans la confection de ces vaccins, tous les sucs musculaires comme ayant la même valeur.

Si par ces considérations nous voudrions démontrer la difficulté qu'on a d'avoir un vaccin, on n'aurait pas de difficulté à prouver le contraire au moyen des statistiques favorables qui démontrent l'efficacité du vaccin préparé par ce procédé. Mais, ce que nous voulons démontrer c'est qu'il est très aisé de donner l'immunité contre le charbon symptomatique. Du reste, on trouve la confirmation de cette assertion dans le succès des immunisations faites avec les produits les plus différents, d'état physique divers et administrés par des voies si variées.

Il y a beaucoup de procédés, mais ils sont d'action inconstante, les uns de difficile application et préparés selon une technique très primitive. Une maladie contre laquelle on peut immuniser avec une si grande facilité ne doit pas être combattue au moyen de vaccins dont l'existence ne pourrait être tolérée qu'au commencement de l'époque bactériologique.

Dans les études sur les vaccins employés contre le charbon symptomatique on a fait, jusqu'à présent, abstraction des corps microbiens morts, qui se comptent par milliers à côté des centaines de spores qu'on inocule. Kitasato (1889) avait dejà observé que les vieilles cultures tout à fait dépourvues de virulence peuvent immuniser. Dans ces cultures, vû le milieu où elles étaient faites, on peut considérer comme morts tous les germes qu'elles contenaient.

Cette idée qui nous est venue seulement pour expliquer l'activité de vaccins préparés selon de procédés si hétérogènes est tout à fait démontrée par l'inoculation de cultures vaccinantes qui confèrent l'immunité sans qu'on puisse attribuer celle-ci à une atteinte legère par la maladie ou à la petite quantité de spores inoculés — quel-

negativas. Estas culturas quando inoculadas, mesmo em pequenas dozes (1/2 c. c.), imunizam.

Daremos aqui apenas algumas indicações sobre a morfolojia e biolojia em que estamos de acordo com KITT (1902) e HIBLER (1899).

O aspeto das culturas em gelatina que observamos é de pequenas colonias de limites bem nitidos, brancas e que com o dezenvolvimento vão fluidificando o meio. Em agar-soro, — a adição de soro é o unico meio de se obter culturas em agar com a nossa amostra, — a forma varia com a concentração do meio, de modo que com uma concentração correspondente a 1 % de agar se obtem um aspeto que consideramos carateristico — as colonias são grandes, nebulozas, perfeitamente esfericas, de contornos bem definidos e sem a menor aparencia de filamentos. O centro da colonia é marcado por um ponto mais escuro. As culturas em meios liquidos nada mostram de diferente do já conhecido. A variedade de aspeto dos elementos que aparecem nas culturas corresponde ao já descritos por HIBLER e SCHATTENFROH.

A amostra que izolámos possue no mais alto gráo a propriedade de formar granuloze em meios glicozados. Quando a cultura está em plena vejetação aí são abundantes as formas em fuzo, esfericas e todas as variantes possiveis entre essas duas extremas. Diferimos, porem, completamente de HIBLER em não considerar a auzencia de esporos nos meios glicozados como devido a acidez do meio, isto, porque, nem a neutralização dos acidos formados, pela adição de carbonato de calcio ao meio de cultura, como pelo fato de uma maior alcalinidade do meio não evitar a ação impedidora que a glicoze e outros assucares exercem sobre a formação de esporos. A formação de esporos foi em identicas condições sempre menor com a nossa amostra que com duas outras com que trabalhámos, uma de KITT, de Munich e outra que izolámos de uma pó virulento de orijem suissa

ques dizaines — ainsi que par le fait qu'on ne peut pas rendre plus actives ces inoculations au moyen de l'acide lactique, ou d'autres substances chimiotactiques négatives. Ces cultures immunisent même inoculées en petites doses (1/2 cc.)

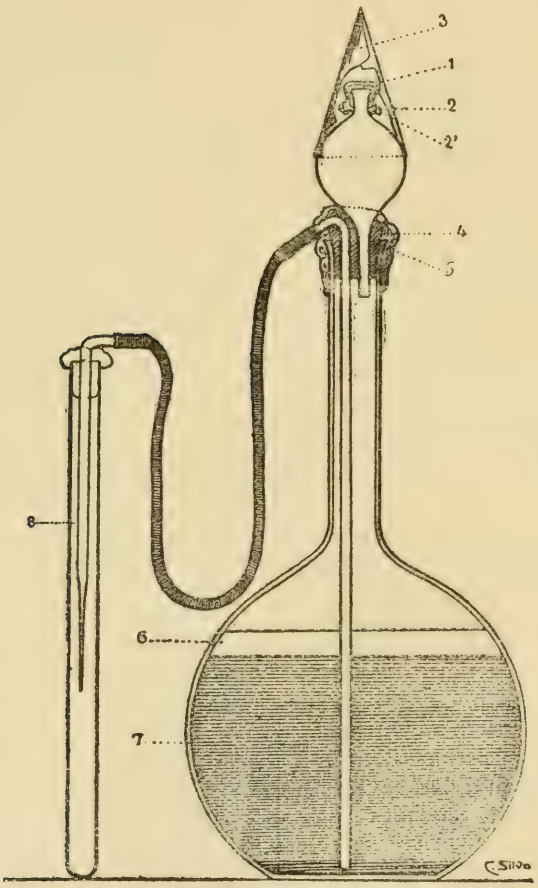
Nous passons à donner quelques indications sur la morphologie et biologie du bac. du charbon symptomatique en ce que nous sommes, en général, d'accord avec KITT (1902) et HIBLER (1899).

Les cultures en gélatine se font sous l'aspect de petites colonies, à contours nets, blanches et qui, au bout de quelque temps fluidifient le milieu. En agar-sérum — l'addition du sérum est le seul moyen de faire végéter notre échantillon sur agar — la forme de la colonie varie selon la concentration de la gelée ; avec une consistence qui correspond a 1 % d'agar nous avons des colonies qui ont un aspect que nous considérons caractéristique. Elles sont grandes, nébuleuses, parfaitement sphériques, à contours bien nets, sans filaments. La partie centrale de la colonie est marquée par un noyau plus foncé. Les cultures en milieux liquides ne diffèrent en rien de ce qui est déjà connu pour ce microbe. Les différences morphologiques des unités microbiennes dans les cultures sont bien celles qui ont été déjà signalées par HIBLER et SCHATTENFROH.

L'échantillon que nous avons isolé possède au plus haut degré la propriété de produire granulose dans les milieux glycosés. Dans les cultures bien développées on voit les formes en fuseau à côté des formes sphériques avec toutes les intermédiaires entre ces deux formes extrêmes. Nous ne sommes, cependant, point d'accord avec HIBLER en ce qui concerne la manière de considérer l'absence de spores dans les milieux glycosés comme étant due à l'acidité du milieu et cela parcequ'il n'est pas possible d'arrêter cette action empêchante de la glycose et d'autres sucres sur la formation des spores, si on neutralise par le carbonate de soude les acides formés ou si on emploie un milieu plus alcalin. Toutes choses égales d'ailleurs, la production de

que devemos á amabilidade do Dr. Carini. O que dissemos a respeito dos esporos podemos dizer quanto a virulencia das culturas, assim em um dos ensaios a cultura Kitt matava cobaias na doze de $^1/_{1000}$ cc., ao passo que a nossa não matava sinão a $^1/_2$ de c. c. As culturas da nossa em meio glicozado foram sempre avirulentas, não se dando o mesmo com as outras.

spores a été moindre avec notre échantillon qu'avec celles de Kitt de Munich, et d'une autre de provenance suisse que nous avons reussi à isoler d'une poudre virulente qui nous a été aimablement fournie par M. le Dr. Carini. Ce que nous avons dit sur la production des spores peut être appliqué à la virulence des cultures. Ainsi l'échantillon Kitt tuait le cobaye à la dose



Balão para preparo e distribuição de vacina.

1. Camada de algodão.
2, 2 a. Duplo revestimento de papel.
3. Cartucho de papel.
4. Camada de algodão que proteje a rolha.
5. Rolha de borracha.
6. Camada de vazelina liquida.
7. Trocarte para entrada de sôro e distribuição da cultura.

Balion disposé pour la préparation et distribution du vaccin.

1. Couche d'ouate.
2, 2 a. Double couche de papier.
3. Cornet en papier.
4. Couche d'ouate protégeant le bouchon.
5. Bouchon en caoutchouc.
6. Vaséline liquide.
7. Trocart. (Entrée du sérum et distribution de la culture).

As culturas destinadas a vacinação são preparadas em balões de 2 litros em que se coloca 1 litro de caldo de carne com 2 % de glicoze, adiciona-se parafina liquida até que se forme uma camada de cerca de 2 cm. de altura sobre o meio de cultura. Quando resfriado, ajunta-se 1/3 ou 1/2 litro de soro de cavalo. Um dispozitivo muito pratico e seguro para essa adição de soro, assim como para a sementeira dos balões é o reprezentado pela figura acima, cuja descrição minucioza e funcionamento se encontram no trabalho de Gomes Faria (1908) ; a figura, entretanto, é assaz clara e permite a sua compreensão.

E' fóra de duvida que as culturas em meio glicozado-soro imunizam. Damos a seguir as primeiras inoculações que fizemos e que serviram de base á pratica da vacinação em grande :

Quadro 4

N. do vitelo	Quantidade de cultura vacinante inoculada em c. c.	Prova	Numero de dias decorridos entre a vac. e a prova
3	2.0	5.0 c. c. de cultura em caldo sangue.....	15 dias
5	5.0	2 c. c. de cultura em caldo sangue.....	30 dias
15	0.5	2 c. c. suco de musculo em natureza do vitelo 40....	7 mezes
16	0.5	1 gr. material seco vit. 1-40	90 dias
17	0.5	1 gr. material seco vitelo 1..	70 dias
18	2.0	1 gr. material seco vitelo 1..	72 dias
19	2.0	2 c. c. suco de musculo em natureza do vitelo 40....	3 mezes
20	2.0	1 gr. material seco vit. 1-40	3 1/2 m.
22	3.0	2 c. c. suco de musculo em natureza do vitelo 40...	3 mezes
23	5.0	1 gr. material seco vitelo 1..	2 mezes
24	15.0	1 gr. material seco vitelo 1..	2 mezes
55	10.0	2 c. c. de cultura em caldo sangue mais acido latico	50 dias
56	10.0	2 c. c. de cultura em caldo sangue mais acido latico	49 dias

Temos a fazer notar que a não ser o vitelo 22 nenhum outro teve a menor reação, sendo que o material com que foi inode $^1/_{1000}$ cc., et la nôtre ne le faisait qu'à la dose de $^1/_2$ cc. Nos cultures sur milieux glycosés ont été toujours avirulentes ce qui n'arrivait pas avec les autres échantillons.

Nous préparons notre vaccin en semant 1 litre de bouillon de viande glycosé à 2 %, placé dans un ballon de 2 litres. On verse sur le milieu de culture une couche de 2cm. de parafine liquide et après stérilisation et refroidissement on ajoute $^1/_3$ ou $^1/_2$ de sérum stérile de cheval. Pour faciliter l'addition du sérum et pour faire les ensemencements nous employons le dispositif figuré par le dessin ci-dessus, dont la description et le fonctionnement se trouvent dans le travail de Gomes de Faria (1908).

C'est incontestable que les cultures du bac. du charbon symptomatique en bouillon-sérum glycosé immunisent. Le tableau qui suit donne une idée de quelques résultats obtenus au laboratoire et qui ont servi de base pour les vaccinations en grand.

Tableau 4.

Veaux N.°	Quantité de culture inoculée en cc.	Inoculation d'épreuve	Nombre de jours entre la vaccination et l'inoculation d'épreuve
3	2.0	5cc. de culture en bouillon-sang.....	15
5	5.0	2cc. it.....	30
15	0.5	2cc. de suc de muscle du veau nº 40.....	210
16	0.5	1 gr. matériel sec des veaux—1-40.....	90
17	0.5	1 gr. m. sec veau 1.....	70
18	2.0	id.....	72
19	2.0	2 cc. suc muscle v. 40..	90
20	2.0	1 gr. mat. sec v. 1–40..	105
22	3.0	2 cc. suc musculaire veau 40.....	90
23	5.0	1 gr. mat. sec v. 1....	60
24	15.0	id.....	60
55	10.0	2 cc. culture bouillon-sang additionés d'acide lactique.....	50
56	10.0	id.....	49

Il n'y a que le veau n. 22 qui ait eu une réaction, les autres n'ont rien eu. Le matériel qui a été inoculé au veau n. 3 a

culato o 3 matou, inoculado na mesma ocazião e doze, o vitelo 2 ; a cultura inoculada no 5 tambem matou em identicas condições o 6 e 7 ; as culturas que inoculámos no 55 e 56 eram muito ricas em esporos. Alguns vitelos (17, 18, 23 e 24) foram inoculados com o material 1, do qual já tratámos no quadro n. 2.

Fizemos por essa ocazião a vacinação na fazenda do Dr. Villaça, em Juiz de Fora e todos os vitelos assim tratados rezistiram, não só á infecção natural, como á inoculação de prova. Mais tarde tivemos, em 24 vitelos vacinados, 8 mortes. Esse acidente veio esclarecer definitivamente o problema da vacinação e mostrar que vacinas que são inocuas para cobaias não garantem a auzencia de cazos por ocazião da vacinação. Estas culturas que se mostraram ricas em esporos não eram, porem, quando inoculadas em cobaias, mortais para ellas, ou, em outras palavras, a doze minima mortal para os vitelos póde estar abaixo da doze mortal minima para a cobaia.

Como consequencia passámos a dozar as nossas culturas vacinantes pela contajem do numero de esporos em 1/2 c. c., isto é, 1/4 da doze que inoculamos como vacina. Para esta dozajem ajuntámos 0.5 de centimetro cubico da vacina a 6—8 de soro de cavalo, esta mistura é feita em um tubo de ensaio, no qual se adiciona finalmente a quantidade de agar glicozado para que o tubo fique quazi cheio, ajita-se bem, e, quando gelificado, coloca-se na estufa a 37°. No 2.° dia as colonias podem ser contadas e não devem exceder de 200, porem é, somente, na maioria das vezes, de apenas algumas dezenas.

A pratica de milhares de inoculações mostrou que uma só inoculação é suficiente para conferir a imunidade durante todo o tempo em que são os animais habitualmente atacados. A conservação das propriedades destas culturas tem se mostrado muito longa. Nos frascos fechados á lampada, como é fornecida, é de muitos mezes.

Na falta de estatistica regular apre-

tué dans les mêmes conditions le témoin n. 2.

La culture inoculée au veau n. 5 a tué les témoins ns. 6 et 7 ; les cultures inoculées aux animaux n. 55 et 56 étaient très riches en spores.

Quelques veaux (ns. 17, 18, 23 et 24) ont été inoculés avec le matériel 1 dont nous avons parlé au tableau n. 2.

Nous avons essayé le vaccin en grand, à la ferme de Mr. le Dr. Villaça, à Juiz de Fóra où tous les animaux immunisés ont résisté à l'infection naturelle et à une inoculation d'épreuve.

Plus tard dans un autre essai nous avons eu 8 morts parmi 24 veaux vaccinés.

Cet accident est venu résoudre d'une façon définitive le problème du vaccin et nous a montré que le vaccin non virulent pour le cobaye peut donner des cas parmi les veaux et ainsi nous avons vérifié que la dose minima mortelle pour les veaux est au dessous de la dose minima mortelle pour les cobayes.

Nous avons alors dosé notre vaccin en faisant la numération des spores dans 1/2 cc. de vaccin, c'est à dire dans le quart de la dose vaccinante. Pour faire cela nous ajoutons à 0,5 cc. de vaccin 6 à 8 cc. de sérum stérile de cheval. Ce mélange est fait dans un tube d'essai dans lequel on verse après, la quantité d'agar-glycosé suffisante pour le remplir à peu près. On agite le tout et on laisse prendre le milieu qui est, alors placé à l'étuve à 37° C. Au deuxième jour on fait la numération des colonies, qui ne doivent pas surpasser le numéro 200. À la majorité des cas il n'y en a même que quelques dizaines.

La pratique de nombreuses, vaccinations a démontré qu'une seule inoculation est suffisante pour immuniser les animaux pendant le temps qu'ils ont plus de receptivité. Le vaccin se conserve assez longtemps ; pendant beaucoup de mois il se conserve actif dans les flacons fermés à la lampe, où il est fourni. En défaut d'une statistique nous présentons ci-dessous les nombres

sentamos o numero de dozes progressivamente crecente fornecidas pelo Instituto:

Em 1906	11.780
» 1907	47.700
» 1908	71.895
» 1909	188.970
Total	320.345

Não se trata, pois, de um processo em ensaio, mas de um que merece ser propagado e vir a substituir os processos empiricos até hoje em uzo.

toujours croissants des doses de vaccin fournis par notre Institut:

1906	11.780
1907	47.700
1908	71.895
1909	188.970
Total	320.345

On voit par ce que nous venons d'exposer qu'il ne s'agit point d'un procédé d'essai, mais d'une méthode qui doit remplacer les procédés empiriques en usage jusqu'à présent.

BIBLIOGRAFIA.

Arloing, Cornevin et Thomas	1887	Le charbon symptomatique du boeuf.
Godoy (Dr. A.) . . .	1909	Sobre a peste da manqueira. — A Lavoura, Ano XIII. N. 10, pag. 293.
Godoy (Dr. A.) e Gomes de Faria (Dr.) . .	—	Sobre um novo processo de vaccinação contra o carbunculo symptomatico. Memoria aprezentada ao Sexto Congresso Brazileiro de Medicina e Cirurgia — *in* Revista Medica de S. Paulo, Ano XI, N. 16, pag. 338.
Gomes de Faria (Dr.) .	1908	Contribuição ao estudo do carbunculo symptomatico. — Dissertação inaugural.
Grassberger (R.) u. Schattenfroh (A.)	1904	Ueber Buttersäuregärung. (III Abhandlung.) etc. — Archiv für Hygiene, Bd. 48, S. 1.
Hibler (E. v.) . . .	1899	Beiträge zur Kenntnis der durch anaërobe Spaltpilze etc. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. XXV Bd. S. 513.
Ktisato (S.)	1889	Ueber den Rauschbrandbacillus und sein Culturverfahren. Zeitschr. f. Hyg. 6 Bd. S. 105.
Kitt (Prof. Dr. H.) .	1902	Neues über Rauschbrand. Monatshefte f. prakt. Thierheilk. Bd. 13. S. 174.
Leclainche (E.) et Vallée (H.) . . .	1902	Les accidents consécutifs aux vaccinations. Annales de l'Institut Pasteur. T. 6e, pag. 614.
Rocha Lima (Dr. H. da)	1906	Peste de manqueira ou carbunculo symptomatico. Conferencia realisada perante a Sociedade de Medicina e Cirurgia de Juiz de Fóra e publicada no *Pharol* de 5 de Junho de 1906 *in Brazil-Medico*. Ano XX, pag. 246.

Contribuição para a sistematica helmintolojica brazileira. (*)

II

Dicrocoelium infidum n. sp. Parazito da vezicula biliar da Eunectes murina. L.

PELO

Dr. Gomes de Faria.

(Com a Est. 2.)

Contribution towards the classification of brazilian Entozoa. (*)

II

Dicrocoelium infidum, n. sp., parazite of the gall bladder of Eunectes murina. L.

BY

Dr. Gomes de Faria.

(With plate 2)

No correr de estudos, a que procederam, neste Instituto, os Drs. Max Hartmann e Carlos Chagas sobre as hemogregarinas das cobras, muitos destes animais foram sacrificados e cuidadozamente autopsiados. Dentre elles foi examinado um grande exemplar de *Eunectes murina L.* enviado do N. O. do E. de S. Paulo (Brazil) pelo Dr. Arthur Neiva. Acompanhando estas necroscopias, encontramos na vezicula biliar um trematodeo bastante interessante, do qual não pudemos encontrar noticia em toda a literatura o que nos leva a crêr que se trata de nova especie cuja descrição passamos a relatar.

Dicrocoelium infidum n. sp. : — Este parazito foi visto em grande quantidade na vezicula biliar da *Eunectes murina L.* Foram encontrados cerca de 30 exemplares livres na bile ou lijeiramente colados ás

(*) A primeira destas contribuições foi publicada *in* Memorias do Instituto Oswaldo Cruz : Tomo I, fac. 2, pag. 99. Novo parazito etc. *Echinostomum crotophagae* Faria.

Source of material.—Whilst studying snake hemogregarines at our Institute Drs. Max Hartmann and Carlos Chagas had occasion to autopsiate and carefully examine a large number of these reptiles. From the gall bladder of a large specimen of *Eunectes murina*, sent by Dr. Arthur Neiva, from the north-western part of the state of S. Paulo, we collected quite an interesting trematode, which we consider a new species, as we find no reference to this parasite in the papers at our disposal.

Description of the trematode *Dicrocoelium infidum* n. sp.

Abundance of parasite.—We found more or less 30 specimens in the gall bladder either floating in the bile or slightly fastened to the walls of the bladder.

Shape.—Oval in outline and flattened,

(*) The first article was published *in* Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, T. I., Fac. II, pag. 99. *Echinostomum crotophagae* Faria. A New parasite, etc.

paredes deste orgam. Nos *canais biliares* não foram encontrados. Aprezentavam-se como pequenos vermes chatos e ovados com a extremidade anterior afilada e a posterior arredondada, brancos com uma mancha parda amarelada no meio do corpo, e muito pouco moveis.

Não podendo estudar imediatamente o material colecionado fixámos uma parte com liquido de HOFER, seguindo a tecnica recomendada por BRAUN e LUEHE (1909), sendo o resto conservado em alcool com as precauções uzuais.

Quanto ás dimensões, o maior observado media 3,5 mm. de comprimento e o menor 3,0 mm. A largura orçava em 2,0 mm. chegando até 2,2 mm. Medimos 6 exemplares :

1º	Ex.	Comprim.to	3,5mm	Largura	maxima	2,0mm
2º	»	»	3,5 »	»	»	2,2 »
3º	»	»	3,5 »	»	»	2,0 »
4º	»	»	3,1 »	»	»	2,1 »
5º	»	»	3,0 »	»	»	2,2 »
6º	»	»	3,1 »	»	»	2,1 »

As dimensões das ventozas não são muito constantes ; tomámos em 2 exemplares os seguintes dados :

Ex. N. 1. — 3,5 mm. de comprimento. Ventoza anterior : Diametro ant. posterior 422 μ ; diametro transversal 548 μ Ventoza ventral (circular) 580 μ.

Ex. N. 2. — 3,5 mm. de comprimento. Ventoza anterior : Diametro ant. posterior 464 μ ; diametro tranversal 424 μ. Ventoza ventral (circular) 560 μ.

Nesta especie, portanto, a ventoza ventral é sempre um pouco maior que a anterior. A pele é pouco espessa, granuloza, rugoza e distintamente atravessada por linhas curvas, que se estendem ao longo do corpo transversalmente. Na parte posterior é armada de espinhos muito finos e pequenos até o nivel da ventoza ventral, depois torna-se inerme e quazi liza apenas percorrida por estrias transversais.

Ventoza ventral. — Esta ventoza pouco dezenvolvida, é circular, séssil, e fica situada para o terço anterior do corpo, ocupando a linha mediana.

with an attenuated cephalic and a bluntly-rounded caudal extremity.

Colour. — White with a yellowish brown spot in the middle of the body.

Movements of the worm—The movements of the trematode are extremely slow.

Condition of material.—Not being able to study at once all the specimens collected, part were kept in HOFER's liquid, following BRAUN and LUEHE's instructions, and the rest were put up in alcohol.

Measurements—The largest specimen attained 3.5mm. in maximum length, and the smallest 3mm. The maximum breadth varies between 2.0 and 2.2mm.

We measured six specimens :

1st	specimen	Max. length	3,5mm	Max. breadth		2,0mm
2nd	»	»	3,5 »	»		2,2 »
3rd	»	»	3,5 »	»		2,0 »
4th	»	»	3,1 »	»		2,1 »
5th	»	»	3,0 »	»		2,2 »
6th	»	»	3,1 »	»		2,1 »

The suckers vary also in size :

1st specimen.—3.5mm. in length.

Oral sucker : Maximum length 422 μ.
» breadth 548 μ.
Ventral sucker (round) : 580 μ.

2nd specimen.—3.5mm. in length.

Oral sucker : Maximum length 464 μ.
» breadth 424 μ.
Ventral sucker (round) : 580 μ.

As we see the ventral sucker is always larger than the oral one.

Surface.—Thin skinned, granulous, wrinkled and crossed by curved lines, which cover the whole length of the body. The caudal extremity is covered with small slender spines until the acetabulum. The surface then becomes almost smooth and crossed by transverse lines.

Ventral sucker :—Round, sessile and not well developed this sucker is situated in the anterior third of the body, occupying the median line.

Digestive tract :—The oral sucker is terminal and almost elliptic, the antero-

Aparelho dijestivo. — A ventoza bucal é terminal, de contorno quazi eliptico; o diametro antero-posterior é menor que o transverso. Provida de fraca musculatura, mostra uma abertura quazi sempre triangular. A' ventoza faz continuação quazi imediata o farinje, pequeno, porem bem dezenvolvido e tendo a forma de tonel. Tomámos as seguintes dimensões em 2 exemplares:

1.º Ex. — 3,5 mm. de comprimento.
Diametro transversal maximo: — 186 μ.
» antero-posterior: — 134 μ

2.º Ex. — 3,5 mm. de comprimento.
Diametro transversal maximo: — 190 μ.
» antero-posterior: — 190 μ.

Ao farinje segue-se o ezofago, tubo longo e fino que se encontra cercado de certo numero de celulas, cuja estrutura pouco pudemos observar.

Depois deste orgam o tubo dijestivo se bifurca para formar os dois cécos. Na sua orijem estes 2 tubos são de calibre bastante estreito, alargando-se logo depois. Estão colocados simetricamente e em paralelismo com as bórdas do corpo, estendendo-se até a extremidade posterior e descrevendo quazi uma elipse. Estão dispostos completamente para dentro das glandulas vitelójenas, circumscrevendo dentro da elipse os testiculos, ovarios, ventoza ventral e quazi todas as ramificações do utero.

Aparelho excretôr. — Este aparelho é pouco dezenvolvido, em grande numero de preparados que examinámos, apenas as porções mais importantes pudemos observar. Em traços rapidos reduz-se a um póro excretor, mediano, posterior, ao qual se segue um pequeno e curto canal, que conduz á *vezicula excretôra* muito pequena e donde saem dois tubos finos, irregulares na trajetoria e no diametro, dirijindo-se para diante, passando entre as glandulas vitelójenas e os cécos e indo terminar ao nivel do farinje. A estes tubos, que se podem estudar perfeitamente, afluem outras pequenas ramificações cuja direção é quazi impossivel acompanhar.

posterior diameter is larger than the transverse one. Provided with weakly-developed muscles the oral sucker has a triangular aperture. Extending caudad from the oral sucker a small, well-developed, barrel-shaped pharynx may be distinguished. Two specimens gave the following measurements in millimeters.

1st specimen.—3.5mm. in length.
Maximum length 134 μ.
» breadth 186 μ.

2nd specimen.—3.5mm. in length.
Maximum length 190 μ.
» breadth 190 μ.

Extending from the pharynx a long narrow esophagus, surrounded by cells, the structure of which we could not describe, can be seen. We observed next the bifurcation into 2 intestinal ceca. Quite narrow at first the ceca increase gradually in diameter. In their course they follow on each side the lateral margins, till near the posterior extremity of the body, describing almost an ellipsis. Bounded externally by the vitellaria the ceca surround the testicles ovary, acetabulum and almost all the ramifications of the uterus.

Excretory tracts.—The excretory system is not well developed. Although we examined a large number of microscopical films we could only describe the most important parts of the system.

In resume, we can say that the system consists in a median posterior excretory pore and a small narrow tract extending till the excretory vesicle, which is very small. Two narrow irregular tubes rise from the vesicle, pass cephalad between the vitellaria and ceca, and terminate at the level of the pharynx. Opening in these tubes small ramifications may be distinguished. We found it quite impossible to accompany the trajectory of these ramifications.

Organs genitais : — O póro genital tem séde adiante da ventoza ventral um pouco para fóra da linha mediana do corpo. O atrio ou seio genital onde se abrem os organs macho e femea não é muito dezenvolvido e de sua textura nada observámos que mereça relação.

Os testiculos em numero de dois, ficam situados ao lado e ao nivel da ventoza ventral. São arredondados, alongados, porém, no sentido antero-posterior e de contorno muito irregular, sobretudo na face voltada para as bordas onde são larga e irregularmente chanfrados, sendo a face interna, que fica em contato com a ventoza ventral mais regular ; em alguns exemplares, completamente plana ou provida apenas de pequenas saliencias e depressões. Estão, em geral, no mesmo plano do corpo e as dimensões dos dois organs variam no mesmo exemplar. As dimensões observadas são :

Ex. de 3,5 mm. de comprimento :

Test. direito : Diametro antero-posterior 584 μ.
Diametro transversal max. 242 μ.
Test. esquerdo : Diametro antero-posterior 528 μ.
Diametro trans. maximo 294 μ.

Ex. de 3,5 mm. de comprimento :

Test. direito : Diametro antero-posterior 670 μ.
Diametro tranversal max. 380 μ.
Test. esquerdo : Diametro antero-posterior 630 μ.
Diametro trans. maximo 420 μ.

Os vazos deferentes partem do meio da face interna dos testiculos, cruzando quazi em diametro a ventoza ventral, para se lançarem na vezicula seminal de que o parazito é provido. Esta comunicação se faz na parte posterior extrema do orgam mencionado. A vezicula seminal colocada no fundo da bolsa do cirro é elipsoide e não enovelada.

Imediatamente a ella se segue a *pars prostatica* que é bem dezenvolvida e apenas um pouco menor que o *ductus ejaculatorius* que lhe faz continuação.

O penis é curto, cilindro-conico e lizo e só o pudemos ver encerrado na bolsa do cirro. Todo esse conjunto que descrevemos agora e que forma a parte externa do aparelho genital masculino, se acha encerrado

Genital Organs.—The genital pore is situated cephalad of the ventral sucker, somewhat distant from the median line. The male and female organs open in the atrium. This organ is not at all well-developed. There is nothing particularly interesting about the structure of the atrium worth while describing.

The two testicles are situated laterally and at the level of the ventral sucker. They are ovoid, long and irregularly indented. The internal surface, which conforms closely to the ventral sucker is more regular, in some specimens completely smooth, in others covered with small elevations and depression. The testicles are situated on the same level.

The size of the two organs vary in the same specimen.

Specimen.—3.5mm. in length :—

Left testicle : Maximum length 528 μ.
» breadth 294 μ.
Right testicle : Maximum length 584 μ.
» breadth 242 μ.

Specimen.—3.5mm. in length :—

Right testicle : Maximum length 670 μ.
» breadth 380 μ.
Left testicle : Maximum length 630 μ.
» breadth 420 μ.

The *vasa deferentia* rise from the internal surface of the testicles, cross the ventral sucker almost in the median line, and enter the posterior part of the vesicula seminis. The ellipsoid vesicula is situated in the cirrhus pouch. From the vesicula seminalis rises the well-developed *pars prostatica*, which is somewhat smaller than the *ductus ejaculatorius*, the third part of the male genital system. The penis, which is short and cylindro-conical, we could only observe in the interior of the cirrhus pouch. The external male organs are all situated in the cirrhus pouch. This pouch is

dentro da bolsa do cirro que é muito clara nesta especie. Fica situada, como é caracteristico do genero, logo adiante da ventoza ventral e em parte coberta por esta, tomando pozição inclinada de modo que a abertura externa no atrio se faz fóra da linha mediana. O espaço compreendido entre estes organs e a parede do saco é inteiramente cheio das chamadas celulas prostaticas.

Organs genitais femininos : — O ovario ocupa a linha mediana, imediatamente para traz da ventoza ventral. E' esferico e de superficie liza sem reintrancias nem lobulações. Em dois exemplares aprezentava as seguintes dimensões :

Ex. N. 1. — 3,5 mm. de comprimento : Diametro — 284 μ.

Ex. N. 2. — 3,5 mm. de comprimento : Diametro — 260 μ.

Devido ás alças do utero e principalmente a pigmentação dessa parte do corpo, que se observava em muitos exemplares examinados não pudemos verificar a existencia do *canal de* LAURER e do *receptaculum seminis*. Um pouco para traz do ovario e lateralmente observámos um orgam, só apreciavel parcialmente : o *ootipo* (?).

As glandulas vitelójenas dispoem-se lateralmente e paralelas ás bordas do corpo, para fóra dos tubos laterais do aparelho excretôr e dos cécos intestinais. São formadas de pequenos ácinos que se reunem entre si, tomando aspeto arborecente. Essas glandulas se estendem desde a bifurcação do *tractus intestinalis* até ao nivel do fundo de saco dos cécos. Cada grupo de glandulas vitelójenas dá orijem á dois tubos excretôres, que depois se reunem em um só que vai ter ao *ootipo*.

Esses tubos vetores do material vitelójeno ficam situados ao nivel do meio do corpo um pouco para traz da ventoza ventral. O *utero* fica situado na sua maior parte para traz do ovario, descrevendo circumvoluções complicadas, transversais, ocupando o espaço compreendido entre os dois cécos e excedendo raramente o limite marcado por estes dois organs. Depois deste emaranhamento o utero dirije-se para a

situated cephalad of the acetabulum. This situation is characteristic of the genus *Dicrœlium*.

Partly covered by the ventral sucker the cirrhus pouch is inclined so that the male organs do not open in the atrium in the median line. The rest of the pouch not occupied by these organs is entirely filled with prostatic cells.

Female genital organs :—The ovary is situated in the median line cephalad of the *acetabulum*. It is round and smooth.

Two specimens gave the following measurements in millimeters :

Specimen No. 1.—3.5mm. in length. Diameter 284 μ.

Specimen No. 2.—3.5mm. in length. Diameter 260 μ.

Owing to the presence of the uterine coils and to the pigmentation of this part of the body we could not come to a conclusion about the existence of LAURER's canal and *receptaculum seminis*.

Caudad of the ovary, laterally situated, we observed an organ only partially distinguishable : the ootype. (?).

Parallel to the lateral margins, bounding externally the lateral tubes of the excretory system and the ceca, lay the vitellogene glands, composed of small acinus which, when joined, are tree-shaped.

These glands extend from the bifurcation of the intestinal ceca till the posterior extremity of cecal tubes. From each group of vitellogene glands rise two excretory tubes, which join, forming one tube extending till the ootype. These tubes are situated at just about the center of the body length, caudad of the ventral sucker. The uterus is situated posterior to the ovary. The coils of the uterus fill the field between the

parte anterior do corpo, passando ao lado do ovario, entre os dois testiculos, por baixo do *acetabulum*, dirijindo-se para o atrio. Termina o aparelho genital, a vajina, bastante longa, estriada transversalmente e que se abre no seio genital ao lado da abertura do *ductus ejaculatorius*. Os ovos são de côr amarelada munidos de membrana bastante espessa de duplo contorno, de forma alongada, sendo o polo oposto ao operculo mais afinado e munido de um espessamento. O operculo é bem claro e a casca aprezenta aí duas depressões simetricas. O conteúdo dos ovos é sempre formado de celulas e, entre estas, observam-se gotas de aspeto oleozo de tamanho variavel, granulozas umas e outras claras e brilhantes. Os ovos estudados foram retirados do utero de um exemplar de 3,5 mm. e medíam na média: Diametro antero-posterior: 40 μ e diametro transversal maximo: 20 μ. Os exemplares-tipos, que serviram a esta descrição, encontram-se na coleção helmintolojica do Instituto Oswaldo Cruz sob o numero 68.

Dispensamo-nos neste trabalho de aprezentar uma diagnoze diferencial, visto não termos encontrado, na literatura, especie deste genero, parazitando serpentes e que possa ser confundida com esta, que aprezentamos como nova.

Quanto á colocação no genero *Dicrocoelium* tivemos algumas duvidas diante da diagnoze dada pelo Prof. A Loos (1899) que tem como tipo *Dicrocoelium lanceatum* Stiles e Hassal, e que só pode ser aplicada ás especies de organização anatomica semelhante á daquelle parazito. O mesmo autor pensa que a diagnoze já bastante limitada, ainda o devia ser mais: separando outros generos, como já propôz, *Lyperosomum* (Loos 1899) para o *Dicroc. strigosum* Braun (1899) e *Athesmia* (Loos) para o *Dicroc. heterolecithodes* Braun (1899).

No emtanto Braun (1902) que aceitou as contribuições de Loos, descreve varias especies de *Dicrocoelium* cuja organização

ceca, rarely exceeding this area. The uterus continues cephalad, bounds the ovary laterally, passes between the testicles under the *acetabulum* and reaches the *atrium*. The uterus continues into a long vagina, transversally striated, which opens at the atrium, next to the aperture of the *ductus ejaculatorius*.

Ova:—The ovum is yellowish. The shell is quite thick and has a double outline. The attenuated pole opposed to the *operculum* has a small elevation. At the *operculum* which is easily distinguished, the shell has two symetric depressions.

The ova contain cells, amongst which light, brilliant, granulous drops, with an oily aspect, are to be seen. These drops vary in size. The ova described were collected from the uterus of specimen 3.5mm. in length.

Average dimensions of the ova:—

Maximum length 40 μ.
» breadth 20 μ.

Type specimen Number 68 Helminthological collection. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brazil.

We do not think it necessary to give a differential diagnosis as we did not find in any of the papers at our disposal any trematode of this genus parasite of serpents.

In view of diagnosis given by Prof. Loos, who has for type specimen *Dicrocoelium lanceatum* Stiles and Hassal, we hesitated at first in including the parasite in genus *Dicrocoelium*. The diagnosis of Prof. Loos can only be applied to trematodes possessing identical anatomical characters. Loos thinks also that the boundaries of the genus in question can suffer a certain confinement. *Dicrocoelium stri-*

anatomica é muito semelhante a que agora descrevemos. Acompanhando este ultimo autor na determinação generica, acreditamos não cair em erro; comtudo, não deixamos de pensar com Loos (1899) que uma revizão bastante acurada das especies do genero talvez tivesse como rezultado a separação em varios generos das especies que pela sua organização anatomica e *habitat* semelhantes deixassem claramente ver o seu parentesco natural.

Para terminar este trabalho devemos relembrar que as especies deste genero são raramente parazitos de animais homeotermos e que a nossa especie traz mais esta pequena contribuição para a sistematica helmintolojica.

Manguinhos, 15 — XII — 09.

gosum Braun has been included in genus *Lyperosomum* Braun; and *Dicrocoelium heterolecithodes* Loos, in genus *Athesmia* Braun. Braun (1902), although accepting Prof. Loos's contribution, describes several species of genus *Dicrocoelium* with anatomical characters quite similar to those of the specimen described by us. Accompanying Braun in this particular we subscribe to Loos's opinion that a careful revision of genus *Dicrocoelium* would perhaps lead us to distribute in other genus some of the species actually belonging to this one.

Before finishing we call attention to the fact that worms of this genus are rarely parasites of homeothermical animals.

Manguinhos, 15 — XII — 09.

BIBLIOGRAFIA

Braun . . . . . 1901 Ein neues Dicrocoelium aus der Gallenblasen der Zibetkatze. In Centralblatt für Bakteriologie. Abth. I, Bd. XXX, Jena.

Braun . . . . . 1902 Fascioliden der Vögel. In Zool. Jahrbücher, Bd. XVI, Heft. 1, Abth. f. Systematik.

Braun & Luehe . . . 1909 Leitfaden zur Untersuchung der tierischen Parasiten des Menschen und der Haustier. Wurzburg.

Diesing . . . . . 1850 Systema helminthum. Vindobonae.

Dujardin . . . . . 1845 Historie naturelle des Helminthes. Paris.

Linstow (v.) . . 1878-1889 Compendium der Helminthologie. Hannover.

Loos (A.) . . . . . 1894 Die Distomen unserer Fische und Frösche. In Bibliotheca Zoologica. Heft. XVI. Stuttgart.

Loos (A.) . . . . . 1896 Faune parasitaire etc. In Mémoires de l'Institut Egyptien. v. III, Cairo.

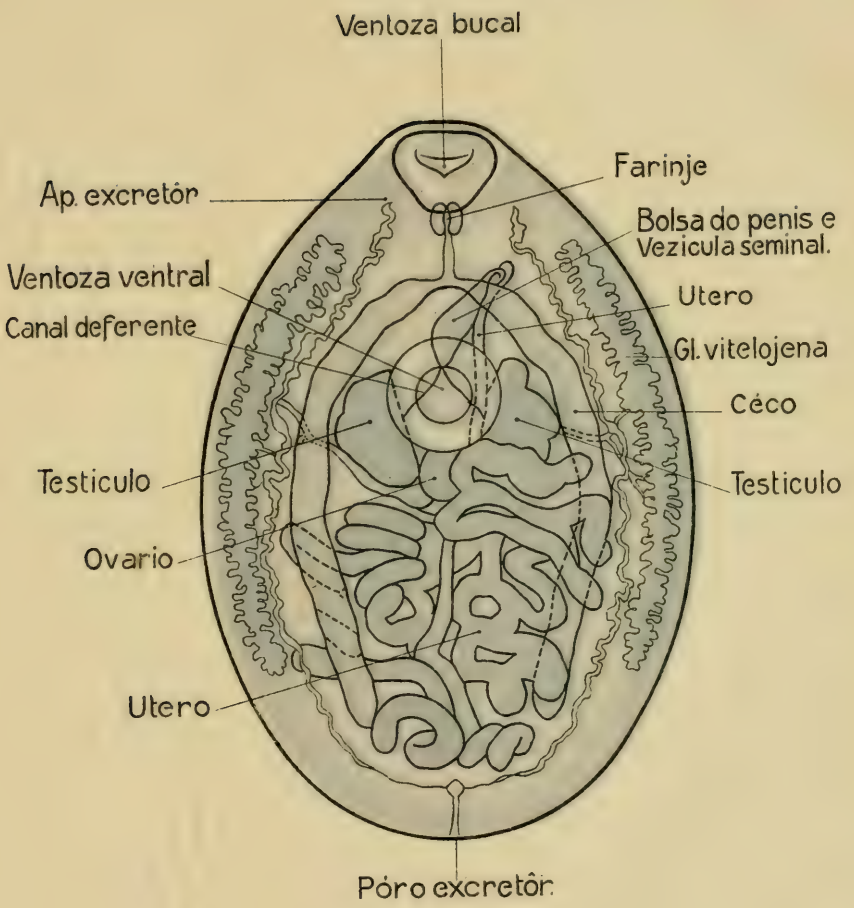
Loos (A.) . . . . . 1899 Weitere Beiträge zur Kenntnis der Trematoden — Fauna Egyptens. Zool. Jahrbücher. Bd. XII, pg. 521, Jena.

Luehe (M.) . . . . 1900 Ueber einige Distomen aus Schlangen und Eidechsen. Centrablatt für Bakteriologie etc. I Abt., Bd. XXVIII. Jena.

Monticeli (Fr. S. de) . 1893 Trematodi endoparassiti. Zool. Jahrbücher, Suppl., Bd. III. Jena.

Stiles (Ch. W.) & Hassal (Alb.) . . 1898 An inventory etc. In Archives de Parasitologie. V. I. Paris.

Stiles (Ch. W.) & Hassal (Alb.) . . 1908 Index-catalogue of medical and Veterinary Zoology. Trematode and Trematode-diseases. Washington.


Ventoza bucal
Farinje
Ap. excretôr
Bolsa do penis e
Vezicula seminal.
Ventoza ventral
Utero
Canal deferente
Gl. vitelojena
Céco
Testiculo
Testiculo
Ovario
Utero
Póro excretôr

Ventoza bucal
Faringe
Ap. excretor
Bolsa do penis e
Vezicula seminal
Ventoza ventral
Utero
Canal deferente
Gl. vitelojena
Ceco
Testiculo
Ovario
Utero
Poro excretor

CASTRO SILVA

Cazos de infeção pelo bacilo paratifico A e pelo Enteritidis (Gaertner)

PELO

Dr. Arthur Moses.

Zwei Beobachtungen über Infektionen durch Paratyphus- und Enteritidis-Bacillen

VON

Dr. Arthur Moses.

Colhidas no correr de algumas pesquizas em torno do grupo colitifo, julgamos interessantes duas observações em que os metodos de laboratorio aplicados ao diagnostico das febres permitiram firmar diagnostico precizo, quando os dados clinicos levariam a inscrever na estatistica mais um cazo de embaraço ou febre gastrica, infeção intestinal ou colibaciloze.

Refere-se a primeira observação a uma infeção paratifica do tipo A. O exiguo numero de infeções desse tipo até hoje rejistrado autoriza-nos a minuciozamente discorrer sobre o cazo que observámos.

Menos frequente que a paratifica do tipo B explicam alguns autores o fato pelo aspeto macro- e microscopico identico das colonias do bacilo tifico e paratifico e a raridade com que se procede á verificação do germen izolado com soro aglutinante para bacilo paratifico do tipo mencionado.

Ainda assim, KAYSER (1906), na Allemanha e NETTER (1906), no norte da Fran-

Folgende zwei Beobachtungen, welche bei Untersuchungen über die *Coli-typhus*-gruppe gemacht wurden, scheinen mir nicht ohne Interesse, weil die Anwendung der Laboratoriumsmethoden eine genaue Diagnose ermöglichte, während man nach dem klinischen Befunde nur Fälle von Magencatarrh, gastrischem Fieber, intestinaler Infection oder Colibacillose verzeichnet hätte.

Die erste Beobachtung bezieht sich auf eine Infection mit Paratyphusbacillen vom Typus A. Bei der geringen Zahl der bisher bekannten Fälle dieser Kategorie scheint eine eingehendere Besprechung meines Falles gerechtfertigt. Das Factum der grössern Seltenheit der Infection mit *Paratyphus* A gegenüber derjenigen mit dem Typus B wird von einigen Autoren dadurch erklärt, dass im ersten Falle die Kolonien des Erregers denjenigen des Typusbacillus macro- und microscopisch gleichen und man den isolierten Keim nur selten auf sein Verhalte zu mit *Paratyphus* A gewonnenem Serum prüft.

Trotzdem teilten 1906 KAYSER in Deutschland und NETTER in Nord-Frank-

ça rejistram pequenas epidemias de 18 a 19 cazos. Alem destas existem observações izoladas de Gwyn (1898), Cushing (1900), Coleman e Buxton (1902), Johnston (1902), Hewlett (1902), Schottmueller (1901), Zupnik e Posner (1903), Blumenthal (1904), Brion e Kayser (1902), Rolly (1909) e Blandini (1903).

Se despercebidos passam os cazos ao exame de laboratorio, menos claros ainda se aprezentam ao clinico.

Contra Huenermann (1902), Lentz (1908) e Vagedes (1905) que acreditam possivel clinicamente distinguir a infeção paratifica, insurjem-se Clemens (1904), Oppel (1905), Conradi v. Drigalski e Juergens (1903), Lembke (1905) e Kayser (1903).

O quadro clinico, ora se aproxima da infeção tifica de media intensidade, ora se confunde com o simples embaraço gastrico.

A distinção é bacteriolojica, nunca sintomatolojica. Na auzencia de dados bacteriolojicos são os processos biolojicos, que permitem tirar concluzões.

Dezaparece inteiramente a diverjencia nas infeções benignas em que a clinica cede logar á microscopia.

Para a hezitação que existe sobre o papel que em patolojia humana reprezenta o paratifo concorre a ignorancia em que estamos das lezões anatomo-patolojicas. Devemos as primeiras necropsías a Gustav Baermann e Otto Eckersdorff (1909) que, em Sumatra, assinalaram, em dous cazos fatais, alterações difuzas do intestino, sem erozão.

No decurso de pesquizas sistematicas de bacilo tifico nas fezes humanas feriu-nos a atenção no Hospital da Mizericordia (serviço clinico do Dr. Austregesilo) um doente em estado febril e que aprezentava

reich kleine Epidemien von 18 und 19 Fällen mit. Ausserdem gibt es Beobachtungen von Gwyn (1898), Cushing (1900), Coleman und Buxton (1902), Johnston (1902), Hewlett (1902), Schottmüller (1901), Zupnik und Posner (1903), Blumenthal (1904), Brion und Kayser (1902), Rolly (1903) und Blandini (1903).

Wenn diese Fälle schon bei der bacteriologischen Untersuchung leicht übersehen werden, so sind sie klinisch noch schwerer zu erkennen. Gegen Hünermann (1902), Lentz (1908) und Vagedes (1905), welche eine klinische Diagnose der Paratyphusinfection für möglich halten, erheben sich Clemens (1904), Oppel (1905), Conradi, v. Digalski und Jürgens (1903), Lembke (1905) und Kayser (1903).

Das klinische Bild nähert sich bald einer Typhusinfection von mittlerer Intensität, bald gleicht es demjenigen eines einfachen Magencatarrhes. Die Kennzeichnung erfolgt durch die Bacteriologie und nicht durch klinische Beobachtung. Bei Fehlen von bacteriologischen Befunden können die biologischen Methoden zu Schlüssen führen.

Zu der Unsicherheit, welche in der menschlichen Pathologie über die Rolle des Paratyphus besteht, trägt besonders die mangelnde Kenntnis der pathologisch-anatomischen Veränderungen bei. Die ersten Leichenbefunde verdanken wir Gustav Baermann und Otto Eckersdorff (1909), welche in zwei Fällen diffuse Veränderungen des Darmes ohne Erosionen erwähnen.

Bei systematischen Untersuchungen menschlicher Fäces auf das Vorkommen von Typhusbacillen erregte ein Patient der Abteilung des Dr. Austregesilo im «Hospital da Misericordia» meine Aufmerksamkeit, der neben einem fieberhaften Zustande nur gastrointestinale Störungen zeigt. Die bacteriologische Blutuntersuchung, welche zwei Tage nach der Auf-

como sintomas unicos, manifestações gastro intestinais.

Exame bacteriolojico. — Em caldo simples e meio enriquecedor de Kayser-Conradi rezultou esteril a hemocultura praticada dias apoz a entrada para o hospital. Com identico rezultado repetimol-o por duas vezes, colhendo material sempre em periodo febril.

Em agar de Drigalski-Conradi e de Endo fizemos largas sementeiras de fezes e urina. Se nas fezes só apareciam colonias de colibacilo, nas urinas, ao lado das colonias vermelhas, que predominavam, encontrámos numerozas outras azuis e redondas, que examinadas ao microscopio revelaram um bacilo curto e movel, descórando-se pelo metodo de Gram. Não nos permitiram identificar o germen a aglutinação macro- e microscopica a que procedemos com soro antitifico e antiparatifico.

Adquirida a noção de que os germens recentemente izolados dificilmente se aglutinam, continuámos a estudar as propriedades culturais do bacilo, transplantando-o diariamente.

Caracteres culturais. — Não liquefaz a gelatina. Não produz indol. Colonias pequenas, transparentes e irizadas, em gelatina. Produção de gazes e fluorecencia em agar de Rothberger-Oldekop. Envermelhecimento e limpidez perzistente em leite de Petruschky. Fermenta glicoze com produção de gazes e não fermenta lactoze.

Ação patojenica. — Quatro miligramas de cultura em agar, em inoculação intraperitonial matam uma cobaia de 300 grs. em 48 horas.

Das aglutininas do soro do doente, da bacteriolize, fixação de complemento e aglutinação do germen izolado, facil é ajuizar pelos quadros seguintes :

nahme vorgenommen wurde, gab ein negatives Resultat, sowohl für Bouillonkulturen, als bei Anwendung des Anreicherungsverfahrens nach Kayser-Conradi ; dasselbe erfolgte bei zweimaliger Wiederholung, wobei das Blut bei bestehendem Fieber entnommen wurde.

Fäces und Urin wurden reichlich auf Agar nach Drigalski-Conradi und nach Endo verimpft ; bei ersteren erschienen nur Kolonien von Colibacillen, dagegen ergab der Urin neben einer Mehrzahl von roten Kolonien zahlreiche blaue von runder Form, welche unter dem Microscope einen kleinen beweglichen Bacillus zeigten, der sich nach Gram entfärbt. Der macro- und microscopische Agglutinationsversuch, den ich mit Antityphus und Antiparatyphusserum vornahm, gestattete die Bestimmung der Bacillen nicht.

Da mir bekannt war, dass frisch isolierte Keime sich schwer agglutinieren, fuhr ich unter täglichem Ueberimpfen fort, die Kultureigenschaften des Bacillus zu studieren. Dieselben verhielten sich, wie folgt :

Gelatine wird nicht verflüssigt. Es wird kein Indol gebildet. Auf Gelatine sind die Kolonien klein, durchsichtig und irisierend. Auf Agar nach Rothberger-Oldekop beobachtet man Gasbildung und Fluorescenz. Petruschky'sche Molke wird rot und bleibt dauernd klar. Glycose wird unter Gasbildung vergoren, Lactose dagegen nicht.

Von pathogenen Wirkungen wurde beobachtet, dass vier Milligramme Agarkultur bei intraperitonealer Injection ein Meerschweinchen von 300 Gramm in 48 Stunden töten.

Ueber die Agglutination durch das Serum des Patienten, die Bacteriolyse, Komplementablenkung und Agglutination des isolierten Keimes geben die folgenden Tabellen Aufschluss :

Soro do doente — Cultura de 20 horas em agar.

Germen	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
B. tifico ..... (Musehold)	0	0	0	0	0	0	0	0
B. paratifico..... (Schottmüller)	++	+	0	0	0	0	0	0
B. paratifico..... (Brion-Kayser)	++	++	++	++	++	++	+	±

Serum des Patienten — Cultur von 20 Stunden auf Agar.

Bacillus	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
Typhi..... (Musehold)	0	0	0	0	0	0	0	0
Paratyphi..... (Schottmüller)	++	+	0	0	0	0	0	0
Paratyphi..... (Brion-Kayser)	++	++	++	++	++	++	+	±

Cultura de 20 horas em agar do escantilhão izolado.

Soro	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
Antitifico.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Antiparatifico..... (Brion-Kayser)	++	++	++	++	++	++	++	++	±
Antiparatifico..... (Schottmüller)	++	0	0	0	0	0	0	0	0

Cultur von 20 Stunden auf Agar des isolierten Stammes.

Serum	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
Gegen Typhus.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gegen Paratyphus.. (Brion-Kayser)	++	++	++	++	++	++	++	++	±
Gegen Paratyphus.. (Schottmüller)	++	0	0	0	0	0	0	0	0

2 horas a 37°

1 hora a 37°					
Soro anti-paratifico (Brion-Kayser)	Emulsão do escantilhão izolado	Soro de cobaia 1/10	Soro de coelho x carneiro 1:1000	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,01	0,2	1 cc.	1 cc.	1 cc.	+
»	0,1	»	»	»	++
»	0,05	»	»	»	+++
»	0,01	»	»	»	+++
0,02	—	»	»	»	+++
—	0,4	»	»	»	+++
—	—	»	»	»	+++

2 Stunden bei 37°

1 Stunde bei 37°					
Serum gegen Paratyphus (Brion-Kayser)	Emulsion des isolierten Stammes	Meerschweinchen-Serum 1/10	Hammelblut-Kaninchen-Serum 1:1000	Hammelblutkörperchen 5 %	Resultat
0,01	0,2	1 cc.	1 cc.	1 cc.	+
»	0,1	»	»	»	++
»	0,05	»	»	»	+++
»	0,01	»	»	»	+++
0,02	—	»	»	»	+++
—	0,4	»	»	»	+++
—	—	»	»	»	+++

Complemento: Soro de coelho	Amboceptor: Soro-antiparatifi o (Brion-Kayser) inativado	Doze de germens	Numero de colonias por placa
0,1	0,1	1/2.500.000 de	4500
»	0,05	alça de uma cultura	4580
»	0,01	de 24 horas em agar	3560
»	0,005	do escantilhão	3560
»	0,001	izolado.	3440
»	—		4460
—	0,1		5700
—	—		6300
0,5	—		0
—	0,5		0

Komplement: Kaninchen-serum	Amboceptor: Serum gegen Paratyphus (Brion-Kayser)	Verwandte Bazillenmenge	Anzahl der Kolonien auf jeder Platte
0,1	0,1	1/2,500,000	4500
»	0,05	Oese einer 24-	4580
»	0,01	stündigen Agar-	3560
»	0,005	cultur des isolierten	3560
»	0,001	Bacillenstammes.	3440
»	—		4460
—	0,1		5700
—	—		6300
0,5	—		0
—	0,5		0

Diz respeito a uma infeção pelo bacilo *enteritidis* do tipo GAERTNER a segunda observação digna de rejistro.

Dificuldades não pequenas surjem na distinção nozolojica da infeção paratifica e da intoxicação alimentar pelo bacilo *enteritidis*, autorizando TRAUTMANN (1904) a considerar a primeira como forma aguda, e a segunda, manifestação subaguda da mesma doença infetuoza. Em favor dessa asserção citam-se as observações de SCHOTTMUELLER (1900) e HETSCH (1906) em que a infeção paratifica se identifica com o mais grave cazo de colera *nostras*. Em periodo epidemico observou HETSCH (1906) nas cercanias de Kobbe cazos outros de infeção paratifica cuja evolução clinica era absolutamente analoga á da colera.

Na impossibilidade de superar as dificuldades, JUERGENS reune todas essas infecções, embora etiolojicamente bem definidas, sob a vasta rubrica de paratifobacilozes.

Para o hospital de izolamento de São Sebastião foi transportado em 12 de Junho de 1909 um doente, trazendo da clinica civil o dubio diagnostico de colerina. Dores abdominais, cefalalgia, forte depressão nervoza, pequena albuminuria, fezes diarreicas, amarelas e fetidas, eis em rezumo o que acuzava o exame clinico.

A esterilidade da hemocultura, assim como a auzencia no soro de aglutininas para qualquer dos germens do grupo coli-tifo foram os primeiros fatos rejistrados.

Dous dias apoz a entrada para o hospital, semeámos fezes em placas de agar de DRIGALSKI-CONRADI. Examinadas 20 horas depois encontrámos, ao lado de colonias de colibacilo, grande numero de outras azuis, redondas e grandes perfeitamente distintas. Eram estas colonias constituidas por bacilos muito curtos, gram-negativos e absolutamente imoveis.

Contrariado, embora, pelo aspeto das fezes julgámos tratar-se de um cazo de di-

Die zweite bemerkenswerte Beobachtung bezieht sich auf einen Fall von Infection durch den *Bacillus enteritidis* vom Typus GAERTNER.

Die klinische Unterscheidung zwischen der Paratyphusinfection und der durch den *bacillus enteritidis* hervorgerufenen Nahrungsmittelvergiftung stösst auf nicht geringe Schwierigkeiten, sodass TRAUTMANN (1904) sich berechtigt fühlte, erstere als acute und letztere als subacute Manifestation derselben Infectionskrankheit anzusehen. Zu Gunsten dieser Angabe werden die Beobachtungen von SCHOTTMÜLLER und HETSCH (1906) angeführt, bei welchen die Paratyphusinfection den schwersten Choleranostrasfällen glich. Zur Zeit einer Epidemie beobachtete HETSCH (1906) in der Umgegend von KOBBE andere Fälle von Paratyphusinfection, deren klinischer Verlauf absolut der Cholera entsprach.

Bei der Unmöglichkeit, diese Schwierigkeiten zu überwinden, vereinigt Jürgens alle diese Infectionen ungeachtet der offenbaren aetiologischen Verschiedenheit unter der weiten Rubrik der Paratyphusbacillosen.

Am 12ten Juni 1909 wurde ein Patient nach dem Isolierspital von SÃO SEBASTIÃO verbracht, bei dem vorher die unsichere Diagnose Cholerine gemacht worden war. Die klinische Untersuchung ergab Leibschmerzen, starke nervöse Depression, mässige Albuminurie und gelbgefärbte, übelriechende, diarrhöeische Entleerungen.

Sterilität der Blutkulturen, sowie fehlende Agglutination mit den verschiedenen Bacillen aus der Colityphusgruppe waren die in erster Linie erhobenen Befunde. Zwei Tage nach Aufnahme beschickte ich Platten mit Agar (nach der Vorschrift von DRIGALSKI-CONRADI) mit Fäces und fand 20 Stunden später neben Colikolonien zahlreiche andere gut characterisierte Kolonien von blauer Farbe, runder Form und beträchtlicher Grösse, welche von sehr kurzen und ganz unbeweglichen, gramnegativen Bacillen gebildet waren.

Trotz des widersprechenden Aussehens der Fäces glaubte ich, dass es sich um einen Fall von bacillärer Dysenterie handle

zenteria bacilar. Proseguindo nesse rumo procedemos á aglutinação microscopica, que foi negativa.

Transplantado aos meios habituais para ulteriores verificações obtivemos mais os seguintes dados: Turva o caldo. Não liquefaz gelatina. Não coagula leite. Colonias brancas lijeiramente granulozas, em agar e gelatina. Cultura abundante em leite de PETRUSCHKY, que se mantem inalterada. Fluorecencia na geloze de ROTBERGER-OLDEKOP. Fermenta glicoze e lactoze com produção de gazes. Auzencia de indol.

Ação patojenica. — Inoculação subcutanea de uma alça normal de cultura mata cobaia e coelho em 3—4 dias. O aquecimento a 70° durante 30 minutos ou a 100° durante 10 minutos não destroe a ação patojenica do bacilo.

Na motilidade do germen está o ponto interessante da observação. Imovel nas culturas em agar era dotado de movimentos ativos, quando semeado em caldo. Transplantado da cultura em caldo para o agar continuava o germen bastante movel. Na noite do dia 15, faleceu o doente e na manhã de 16 autopsiamol-o. Lezões pronunciadas de gastroenterite hemorrajica e lijeiro aumento do baço era o que de mais acentuado aprezentava o exame necroscopico.

Do baço, figado e da mucoza intestinal izolámos um germen que facilmente identificámos com aquele que das fezes haviamos izolado.

A marcha da infeção, as lezões rejistradas em necropsia e os carateres morfolojicos e culturais do germen izolado levavam-nos a acreditar que se tratava de infeção pelo bacilo *enteritidis*.

Para elucidação deste ponto rezolvemos lançar mão dos processos biolojicos de diagnostico. A aglutinação, bacteriolize e fixação de complemento permittiram-nos, não só afirmar tratar-se de um bacilo *enteritidis*, mas ainda do tipo GAERTNER desse germen.

und erprobte in diesem Sinne die mikroscopische Agglutination mit ganz negativem Resultate.

Nach Ueberimpfung auf die gewöhnlichen Nährböden zum Zwecke weiterer Studien stellte ich noch Folgendes fest: Der Bacillus trübt die Nährbouillon, verflüssigt Gelatine nicht und lässt die Milch ungeronnen. Auf Agar und Gelatine bildet er weisse, etwas körnige Kolonien. In PETRUSCHKY'scher Molke wächst er reichlich, ohne dieselbe zu verändern, während er auf Agar nach ROTHEBERGER-OLDEKOP Fluorescenz hervorruft. Glycose und Lactose werden unter Gasbildung vergoren. Indol wird nicht gebildet. Subcutane Einführung einer Normalöse der Kultur tötet Meerschweinchen und Kaninchen in 3—4 Tagen. Erwärmung auf 70 Grad während 30 oder auf 100 während 10 Minuten zerstört die pathogene Wirkung des Bacillus nicht.

Das Hauptinteresse der Beobachtung bezieht sich auf die Beweglichkeit des Bacillus, welcher, in Agarkulturen unbeweglich, dagegen auf Bouillon verimpft lebhafte Bewegungen zeigte. Nach der Uebertragung auf Agar behielt der Keim eine ziemliche Beweglichkeit.

In der Nacht des 15ten starb der Patient und am 16ten machte ich die Autopsie welche als deutlichsten Befund ausgesprochene Zeichen einer hämorrhagischen Gastroenteritis und leichte Milzschwellung ergab. Aus Milz, Leber und Darmschleimhaut gewann ich einen Bacillus, den ich mit dem aus den isolierten Stühlen mühelos identificieren konnte.

Der Verlauf der Infection, die bei der Necropsie erhobenen Befunde, sowie die morphologischen und kulturellen Charactere des isolierten Keimes überzeugten mich, dass es sich um den *bacillus enteritidis* handle. Um diesen Punkt aufzuklären, beschloss ich, mich der biologischen Methoden für die Diagnose zu bedienen. Agglutination, Bacteriolyse und Komplementablenkung gestatteten mir, festzustellen, dass es sich nicht nur um den *Enteritisbacillus*, sondern auch um den GAERTNER'schen Typus dieses Keimes handle.

Cultura de 24 horas em agar do escantilhão izolado

SORO	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
Aglutinante para bacilo enteritidis (Gaertner).....	++	++	++	++	++	+	+	±
Aglutinante para bacilo enteritidis (Guenther) ...	0	0	0	0	0	0	0	0
Aglutinante para bacilo paratifico (Schottmüller)	0	0	0	0	0	0	0	0

Kultur des isolierten Stammes auf Agar (24 St.)

SERUM	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
Agglut. Serum für b. enteritidis (Gaertner).....	++	++	++	++	++	+	+	±
Agglut. Serum für b. enteritidis (Günther).....	0	0	0	0	0	0	0	0
Agglut. Serum für b. paratyphi (Schottmüller)	0	0	0	0	0	0	0	0

2 horas a 37°

1 hora a 37°					
Soro x bacilo enteritidis (Gaertner)	Emulsão do escantilhão izolado	Soro de cobaia $^1/_{10}$	Soro de coelho x carneiro 1:1000	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,02	0,2	1 cc.	1 cc.	1 cc.	+
»	0,1	»	»	»	+
»	0,05	»	»	»	++
»	0,01	»	»	»	+++
0,04	—	»	»	»	+++
—	0,4	»	»	»	+++
—	—	»	»	»	+++

2 Stunden bei 37°

1 Stunde bei 37°					
Serum gegen b. Enteritidis (Gaertner)	Emulsion des isolierten Stammes	Meerschweinchenserum $^1/_{10}$	Hammelblutkaninchenserum 1:1000	Hammelblutkörperchen 5 %	Resultat
0.02	0.2	1 cc.	1 cc.	1 cc.	+
»	0.1	»	»	»	+
»	0.05	»	»	»	++
»	0.01	»	»	»	+++
0.04	—	»	»	»	+++
—	0.4	»	»	»	+++
—	—	»	»	»	+++

Complemento: soro de coelho	Amboceptor soro x bacilo enteritidis (Gaertner) inativado	Doze de germens	Numero de colonias por placa
0,1	0,1	1/2.500.000	4905
»	0,05	de alça de uma cul-	4587
»	0,01	tura de 24 horas em	3568
»	0,005	agar do escantilhão	3560
»	0,001	izolado.	3440
»	—		4800
—	0,1		5200
—	—		6200
0,5	—	—	0
—	0,5	—	0

Komplement: Kaninchen-serum	Anboceptor: Inaktivirtes se-rum gegen b. Enteritidis (Gaertner)	Verwandte Bazillenmenge	Anzahl der Kolonien auf jeder Platte
0.1	0.1	1/2 500 000	4905
»	0.05	Oese einer 24-	4587
»	0.01	stündigen Agar-	3568
»	0.005	cultur des isolierten	3560
»	0.001	Bacillenstammes.	3440
»	—		4800
—	0.1		5200
—	—		6200
0.5	—	—	0
—	0.5	—	0

BIBLIOGRAFIA

Baermann, G. & Eckersdorff O.	1909	Berl. Klin. Wochenschr. No. 40, p. 1802.
Blumenthal, Fr.	1904	Münch. Med. Wochenschr. No. 37, p. 1641.
Brion & Kayser	1902	Münch. Med. Wochenschr. No. 15, p. 611.
Clemens	1904	Deut. Med. Wochenschr. Nos. 8/9, p. 280 e 314.
Coleman & Buxton	1902	Journ. of the Amer. Med. Associat., p. 976.
Conradi, v. Drigalski & Juergens	1903	Zeitschr. f. Hyg. Bd. 42, p. 141.
Cushing	1900	John Hopk. Hosp. Bull.
Netter apud Kayser	1906	Centralbl. f. Bakt. Bd. 40, p. 285.
Gwyn	1898	John Hopk. Hosp. Bull, p. 54.
Hetsch	1906	Klin. Jahrb. Bd. 16.
Hewlett	1902	Journ. of the Amer. Med. Associat., p. 200.
Huenermann	1902	Zeitschr. f. Hyg. Bd. 40, p. 522.
Johnston	1902	Journ. of the Amer. Med. Associat., p. 187.
Juergens	1907	Deut. Med. Wochenschr. Nos. 1/2.
Kayser	1903	Deut. Med. Wochenschr. No. 18, p. 309.
Kayser	1906	Centralbl. f. Bakt. Bd. 40, p. 285.
Lembke	1905	Zeitschr. f. Med. Beamte. No. 8, p. 233.
Lentz apud Konrich	1908	Klin. Jahrb., p. 247.
Oppel	1905	Deut. Med. Wochenschr.
Paladino Blandini	1903	Ann. d'Ig. speriment. T. 15, p. 159 apud Kayser: Centrabl. f. Bakt. Bd. 40, p. 285. 1906.
Rolly	1909	Deut. Arch. f. Klin. Med. Bd. 85, Heft 5/6 apud Lubarsch, O. und Ostertarg, R.: Erg. der Allg. Pathol. u. Anat. des Menschen u. der Tiere.
Schottmueller	1900	Deut. Med. Wochenschr. No. 32, p. 511.
Schottmueller	1901	Zeitschr. f. Hyg. Bd. 36, p. 368.
Trautmann	1904	Zeitschr. f. Hyg. Bd. 46, p. 68.
Vagedes	1905	Klin. Jahrb. Bd. 14, p. 517.
Zupnik & Posner	1903	Prag. Med. Wochenschr. No. 18.

Pesquizas sobre a Polytomella agilis n. g., n. sp.

PELO

Dr. H. de Beaurepaire Aragão,

Assistente.

(Com Estampa 3.)

Untersuchungen ueber Polytomella agilis n. g., n. sp.

VON

Dr. H. de Beaurepaire Aragão,

Assistenten am Institute.

(Hierzu Tafel 3.)

No decurso de pesquizas sobre os protozoarios de agua doce no Instituto, nestes ultimos tempos, muito frequentemente tivemos ocazião de vêr dezenvolver em nossas cubas de cultura, entre numerozas outras fórmas, um flajelado, assaz interessante, com cujo estudo nos ocupámos durante algum tempo.

Constitue motivo do prezente trabalho, o rezultado das observações então feitas, sobre a morfolojia e biolojia do flajelado, durante as quais tivemos sempre a felicidade de poder dispôr dos eruditos conselhos do eminente protozoolojista e nosso mestre o Dr. S. v. Prowazek ao qual aqui deixamos rejistrados os nossos melhores e mais sinceros agradecimentos.

MATERIAL E TECNICA.

O flajelado foi encontrado diversas vezes nas cubas em que colocavamos agua doce de diferentes poços e pequenas fontes das vizinhanças do Instituto, com o fim de obter culturas dos diversos protozoarios dessas aguas. Quando o flajelado em questão aparecia nas culturas geralmente se tornava, desde os primeiros dias, muito abundante, sendo então bastante facil izo-

Während der Untersuchungen, welche an diesem Institute in letzter Zeit über Süsswasserprotozoen angestellt wurden, hatte ich sehr häufig Gelegenheit, in Kulturgefässen neben zahlreichen anderen Formen eine sehr interessente Flagellatenart auftreten zu sehen, deren Studium ich einige Zeit gewidmet habe. Das Resultat der dabei gemachten Beobachtungen über die Morphologie und Biologie dieses Flagellaten bildet den Gegenstand vorliegender Arbeit ; bei diesen Untersuchungen stand mir immer die sachkundige Beratung meines Lehrers, des hervorragenden Protozoenforschers Dr. S. v. Prowazek, zur Verfügung, dem ich hierfür meinen besten und aufrichtigsten Dank ausspreche.

MATERIAL UND TECHNIK.

Das Flagellat wurde mehrere Male in den Gefässen gefunden, in welchen ich Wasser aus verschiedenen Quellen und Tümpeln aus der Nähe des Institutes aufbewahrte, um Kulturen der darin enthaltenen Protozoen zu gewinnen. Wenn dasselbe in den Kulturen auftrat, vermehrte es sich in der ersten Tagen so reichlich, dass es ziemlich leicht gelang, nach der gewöhn-

lal-o em cultura pura em infuzão de folhas de couve, seguindo a tecnica habitual. Nestas culturas elle prolifera abundantemente e nellas se tem esplendido recurso para o seu estudo. E' de toda a vantajem trabalhar com culturas puras, porque, sendo o flajelado, á primeira vista, muito semelhante a uma *Polytoma*, em cuja companhia muitas vezes prolifera, torna-se possivel a confuzão de um com outro protozoario, quando prezentes na mesma cultura.

Nas culturas permanecem por muito tempo vivos os flajelados. E', porém, nas recentes que se observam em melhores condições as diferentes fazes do dezenvolvimento que nelles é, então, mais regular e menos sujeito a dejenerações. Não são, porém, sem vantajem as culturas um pouco antigas. De um módo geral se póde dizer que nos primeiros dias de cultura se observam melhor as fazes de divizão do protozoario e que já as mais idozas se prestam particularmente ao estudo da copulação e do encistamento. O estudo do flajelado foi feito, tanto a fresco, como nas preparações fixadas. Para o exame a fresco muito se recomenda o emprego da gota pendente ou da camara humida; as preparações entre lamina e laminula, ao contrario, são pouco utilizaveis, porque nella rapidamente morre o flajelado á mingua de oxijenio. As colorações vitais escasso recurso oferecem ao estudo do protozoario, pois as materias córantes, *Neutralrot*, azul de metilenio, *Brillantkresilblau* só manifestam as suas propriedades córantes depois da morte do organismo.

Para o estudo da *Polytomella* em preparados fixados, o metodo que melhor rezultado ofereceu, foi o de fazer preparados totais em laminulas cobertas préviamente com lijeira camada de albumina e que tendo ainda o material humido, eram lançadas no liquido fixador. As soluções fixadoras por nós mais frequentemente uzadas, foram o sublimado-alcool e o liquido de Flemming; o formol, o liquido de Hermann, o sublimado-acetico tambem foram experimentados, porem, com rezultado não supe-

lichen Technik eine Reinkultur in einer Infusion von Kohlblättern zu erhalten. In diesem Medium vermehrt er sich sehr reichlich und bietet die günstigsten Bedingungen für seine Erforschung. Die Verwendung von Reinkulturen ist von wesentlichem Vorteile, da sich häufig zugleich mit unserem Flagellaten eine *Polytoma* entwickelt, welcher er auf den ersten Blick sehr ähnlich sieht, so dass eine Verwechslung beider Protozoen möglich wird, wenn sie sich in derselben Kultur vorfinden.

In den Kulturen erhalten sich die Flagellaten lange Zeit lebendig; doch bieten frisch angelegte die besten Bedingungen für die Beobachtung der verschiedenen Phasen der Entwicklung, welche dann regelmässiger vor sich gehen und weniger Degenerationen unterworfen sind; immerhin haben auch etwas ältere Kulturen ihre Vorteile. Im Allgemeinen kann man sagen, dass die Teilungsphasen am besten in den ersten Tagen der Kulturen beobachtet werden, während die älteren sich mehr für das Studium der Kopulation und der Incystierung eignen.

Die Flagellaten wurden zum Teil lebend, zum Teil an fixierten Präparaten untersucht. Für den ersteren Fall empfiehlt sich die Anwendung des hängenden Tropfens oder der Camara humida; dagegen sind Präparate mit aufgelegtem Deckglase weniger zu gebrauchen, da in solchen die Flagellaten durch Sauerstoffmangel rasch absterben. Vitalfärbungen bieten beim Studium der Protozoen geringen Nutzen, da die Farbstoffe Neutralrot, Methylenblau und Brillantkresylblau ihre färbende Eigenschaft erst nach dem Tode des Organismus zeigen.

Beim Studium der *Polytomella* an fixierten Präparaten erhielt ich die besten Resultate, wenn Gesammtpräparate auf Deckgläschen, die zuvor mit einer dünnen Albuminschicht überzogen waren, hergestellt und noch feucht in die Fixierflüssigkeit geworfen wurden. Als solche wandte ich am häufigsten Sublimatalkohol und Flemming'sche Flüssigkeit an; auch For-

rior ao dos liquidos mencionados em primeiro lugar. Tambem uzámos de preparados fixados, depois de secos pelos alcoles absoluto e metilico para as colorações pelo GIEMSA.

A incluzão do material e o seu estudo em córtes mostrou-se de mediocre vantajem.

O metodo de colorações mais apropriado ao estudo da estrutura pelas minucias que oferece é incontestavelmente a hematoxilina férrea, segundo HEIDENHAIN ou MALLORY. A hematoxilina de BOEHMER e a de GRENACHER não revelam com tanta nitidez os finos pormenores de estrutura e o GIEMSA quazi que só encontra emprego no estudo da estrutura dos flajelos.

SISTEMATICA.

A' primeira vista, o flajelado que estudamos, muito se aproxima de uma *Polytoma* pelo aspeto geral ; della se destingue logo porem, por não possuir membrana envolvente, ter quatro flajelos, ao em vez de dois e pela auzencia de entozoma no nucleo, além de outros caractéres em relação com a biolojia entre os quais avulta o processo de divizão, totalmente diferente nos dois protozoarios.

A' medida que formos descrevendo a morfolojia do flajelado e relatando a sua biolojia, ir-se-ão acentuando essas diferenças ; por agóra, não é necessario entrar em maiores minucias a seu respeito. Diverjindo o flajelado das politomas e, por outro lado, não sendo possivel identifical-o com os demais generos conhecidos, forçozo se tornou criar novo genero que denominámos « *Polytomella* » de que fica sendo tipo com a denominação especifica « *agilis* ».

O novo genero, pensamos, deve ser incluido entre os que constituem a familia das *Amphimonadaceae* na classificação de flajelados segundo SENN.

MORFOLOJIA.

O corpo da *Polytomella* tem geralmente a fórma de um ovoide bastante regular, não raro porém, de fórma alongada.

mol, HERMANN'sche Flüssigkeit und Sublimat mit Essigsäure wurden erprobt, doch war das Resultat nicht besser, als bei den erst erwähnten Gemischen. Für die Färbung nach Giemsa verwandte ich auch Präparate, welche nach dem Antrocknen in absolutem oder Methyl-Alkohol fixiert wurden.

Einbettung des Materiales und Schneiden desselben bot für das Studium nur geringe Vorteile.

Zum Studium der Struktur eignet sich wegen der Details, die sie erkennen lässt, unzweifelhaft am besten die Färbung mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN oder MALLORY. BOEHMER'sches und GRENACHER'sches Hämatoxylin zeigen die feineren Einzelheiten nicht mit derselben Deutlichkeit und die GIEMSAfärbung findet fast nur zum Studium der Geisselstruktur Verwendung.

KLASSIFICATION.

Das von mir studierte Flagellat erscheint beim ersten Anblick in seiner Gesammterscheinung einer *Polytoma* sehr ähnlich ; doch unterscheidet es sich von derselben sofort dadurch, dass er vier statt zwei Geisseln, dagegen keine Hüllmembran und im Kerne kein Entosom besitzt, abgesehen von anderen biologischen Charakteren, unter welchen der ganz verschiedene Teilungsprocess oben ansteht. Im Verlaufe der morphologischen und biologischen Beschreibung treten diese Unterschiede deutlich zu Tage, so dass es für den Augenblick überflüssig ist, in weitere Einzelheiten einzutreten.

Da sich dieses Flagellat einerseits von *Polytoma* unterscheidet und andererseits auch mit anderen bekannten Gattungen nicht identificieren lässt, war es nötig, für denselben ein neues Genus aufzustellen ; ich nenne dieses *Polytomella* und die typische Species *agilis*. Ich glaube, dass die neue Gattung in der von SENN (Pflanzenfamilien, Bd. 1) aufgestellten Flagellatenklassification den *Amphimonadinen* zugewiesen werden muss.

Na extremidade mais alargada que é a anterior, aprezenta o flajelado um pequeno rostrilho sob a fórma de calota membranoza que se aplica sobre restrita zona dessa porção do protozoario.

O corpo da *Polytomella* é constituido por uma massa de protoplasma desprovida de membrana, no interior da qual se encontram o nucleo, numerozas granulações e vacuolos pulsateis. Da porção anterior do corpo, logo abaixo do rostrilho, nacem quatro flajelos iguais, dirijidos para diante, que asseguram a mobilidade ao protozoario.

O comprimento da *Polytomella* é, em média, de 17 μ incluido o rostrilho; a largura atinje 8 μ. A seguir passamos á descrição por menor de cada elemento constituinte do corpo da *Polytomella;* antes, porém, chamamos a atenção para as Fig. 1 e 21 da Estampa 3 que facilitam a compreensão da estrutura do flajelado.

PROTOPLASMA.

A *Polytomella* possue um protoplasma de estrutura alveolar, de colorido amarelo palido, pouco refrinjente, aprezentando largas malhas, mais abundantes na porção posterior do corpo, e uma estrutura mais delicada na rejião que fica para diante do nucleo. Em torno ao nucleo e na periferia do flajelado póde observar-se uma orla de alveolos regulares.

A *Polytomella* não possue membrana e apenas uma orla de protoplasma mais condensada e de estrutura fibrilar constitue o limite externo do corpo.

As malhas do protoplasma, acima citadas, são ocupadas por numerozos microgranulos, muito refrinjentes de côr amarela clara, pouco abundantes, arredondados nas fórmas tenras do protozoario e que, com a idade se transformam em curtos bastonetes fuziformes, cujo numero aumenta, e finalmente, todo o protoplasma fica cheio delles. A substancia dessas granulações córa-se em pardo violeta pelo iodo, a frio; aquecida

MORPHOLOGIE.

Der Körper der *Polytomella* zeigt gewöhnlich eine ziemlich regelmässige Eiform, doch ist er nicht selten in die Länge gezogen. An dem breiteren Vorderende zeigt sie einen kleinen Rüssel in der Form einer haubenförmigen Membran, welche einer beschränkten Zone dieser Gegend aufsitzt. Der Körper der Polytomella besteht aus einer membranlosen Protoplasmamasse, welche einen Kern, zahlreiche Granulationen und pulsierende Vacuolen einschliesst. Am Vorderende des Körpers, gleich unter dem Rüssel, entspringen vier gleich lange, nach vorn gerichtete Geisseln, welche diesem Protozoen die Beweglichkeit verleihen.

Die Länge des Protozoen beträgt im Mittel einschliesslich des Rüssels 17 μ, die Breite erreicht 8 μ.

Bevor ich auf eine genauere Beschreibung der einzelnen Elemente eingehe, welche den Körper der *Polytomella* bilden, verweise ich auf die Figuren 1 und 2 der Tafel 3, welche das Verständnis der Struktur dieses Flagellaten erleichtern sollen.

PROTOPLASMA.

Die *Polytomella* besitzt ein Protoplasma von alveolärer Struktur, welches blass-gelb gefärbt und wenig lichtbrechend ist; es zeigt weite Maschen, welche in der hinteren Hälfte des Körpers reichlicher auftreten, und eine zartere Struktur in der vor dem Kerne gelegenen Region. Um den Kern und in der Peripherie des Flagellaten beobachtet man einen Saum von viereckigen Alveolen. Eine Membran ist nicht vorhanden und der Körper wird nach aussen nur von einem Saume verdichteten Protoplasmas von fibrillärer Struktur begrenzt.

Die bereits angeführten Protoplasmamaschen enthalten in grosser Zahl kleine, stark lichtbrechende, hellgelbe Körnchen; in den jungen Formen sind sie spärlich und rund, verwandeln sich aber mit zunehmendem Alter in kurze spindelförmige Stäb-

adquire coloração avermelhada, não é soluvel na agua, no alcool, no éter, no clorofórmio e no xilol ; a ação prolongada da saliva impede a reação do iodo ; ella aprezenta, em suma, caractéres que a fazem aproximar do paraglicójeno.

NUCLEO.

O nucleo acha-se colocado no interior do protoplasma, a meia distancia das extremidades do flajelado. A fresco aparece sob a fórma de pequena vezicula, um pouco menos refrinjente que o protoplasma. Nos preparados córados, e melhor ainda nos a fresco, se percebe a sua estrutura. Verifica-se então que é constituido da seguinte fórma : em primeiro lugar aprezenta uma membrana nitida, de duplo contorno que o limita externamente e em cuja parede interna se vêm aplicadas pequenas massas de cromatina equidistantes e que formam um revestimento e membrana. A esta camada de cromatina segue-se uma zona de substancia acromatica que a izola do cariozoma. Este se aprezenta sob a fórma de pequeno corpusculo esferico, pouco refrinjente a fresco e intensamente córado nos preparados fixados e tratados pela hematoxilina. No interior do cariozoma ainda se póde observar, a fresco, a prezença de pequeno centriolo. O cariozoma não se acha livre no interior do nucleo ; delgadas fibrilas de substancia acromatica ligam-no á parede interna da membrana nuclear e mantem-no constantemente na mesma pozição, no centro do nucleo. De tal modo constituido o nucleo da *Polytomella* aprezenta duas porções distintas, uma periferica, a das massas de cromatina que se aplicam á membrana, outra central ou cariozomica. São ambas constituidas por substancia comparavel á cromatina nuclear e goza cada uma de autonomia que se revela com toda a nitidez por ocazião da divizão, durante a qual se revela o tipo binuclear do protozoario. Tem-se então a impressão de que no nucleo da *Polytomella* ha constituição dupla como se houvesse um nucleo encaixado dentro do outro.

chen, deren Zahl zunimmt, bis sie zuletzt das ganze Protoplasma ausfüllen. Mit Jod behandelt färben sie sich in gewöhnlicher Temperatur violettbraun, beim Erhitzen nehmen sie eine rötliche Färbung an ; in Wasser, Alkohol, Ether, Chloroform und Xylol sind sie unlöslich. Eine längere Einwirkung von Speichel hebt die Jodreaction auf ; kurz, sie zeigen Eigenschaften, welche sie als dem Paraglycogen nahe stehend charactersieren.

KERN.

Der Kern befindet sich im Innern des Protoplasmas, von beiden Körperenden des Flagellaten gleich weit entfernt. Im frischen Präparate erscheint er als ein kleines, etwas weniger lichtbrechendes Bläschen ; nach der Färbung tritt seine Struktur deutlicher hervor und man erkennt nachfolgende Zusammensetzung : In erster Linie zeigt er eine scharf umschriebene, doppelt kontourierte Membran, welche ihn nach aussen begrenzt ; ihrer Innenseite liegen in gleichen Abständen kleine Chromatinmassen an. Auf diese Chromatinschicht folgt eine Zone achromatischer Substanz, welche sie vom Caryosom trennt. Dieses zeigt die Form eines kleinen runden Körperchens und erscheint in frischem Zustande wenig lichtbrechend, in fixierten und mit Hämatoxylin gefärbt Präparaten dagegen intensiv gefärbt ; im ersteren Falle erkennt man noch die Gegenwart eines kleinen Centriols. Das Caryosom liegt im Innern des Kernes nicht frei, sondern durch zarte Fasern achromatischer Substanz mit der Innenseite der Kernmembran verbunden und in seiner Lage in der Mitte des Kernes fixiert. Demgemäss bietet der Kern der *Polytomella* zwei verschiedene Teile, von denen der peripherische durch die der Membran angelagerten Chromatinmassen repräsentiert wird ; der andere ist central und entspricht dem Caryosom. Beide bestehen aus einer Substanz, welche dem Kernchromatin entspricht und sind gegenseitig unabhängig, wie dies ganz deutlich bei Gelegenheit der Teilung zu

Este tipo nuclear tão curiozo não parece raro, nós já o encontrámos na *Amoeba diplomitotica* (1906) e tambem em uma especie de *Bodo saltans* e é provavel que ainda se aprezente em muitos outros protozoarios. Tal estrutura nuclear parece-nos de bastante importancia, pois é carateristica da binucleidade dos protozoarios.

FLAJELOS.

O numero normal de flajelos da *Polytomella* é de quatro que se orijinam de outros tantos corpusculos bazais, dispostos crucialmente, na extremidade anterior do corpo, no limite entre esta e o rostrilho, cuja porção periférica é atravessada pelos flajelos. Delgadas fibrilas rizoplasticas em numero de quatro, geralmente pouco aparentes, estabelecem ligação entre os corpusculos bazais e o nucleo.

Os flajelos são iguais, dirijidos todos para diante, medem cerca de 22 μ de comprimento e têm estrutura homojenia.

VACUOLOS PULSATEIS.

A *Polytomella* aprezenta dois vacuolos pulsateis colocados, um ao lado do outro, na extremidade anterior do corpo, logo abaixo do rostrilho e de cada lado da linha mediana. Estes vacuolos pulsam alternativamente, com pequeno intervalo e não excedem, quando completamente cheios, a 2 ou 3 μ de diametro.

ROSTRILHO.

O rostrilho da *Polytomella* tem a fórma de pequena calota membranoza, transparente, aplicada á extremidade anterior do flajelado. A fórma varía bastante; ora se aprezenta muito saliente, ora achatado; nas fórmas mais regulares orça o seu diametro por 2 μ e a largura não excede a 4 μ. No interior do rostrilho orgam algum; apenas a sua periferia dá passajem aos flajelos, que, como já vimos, nacem lógo abaixo delle.

Tage tritt, welche den binucleären Typus der *Polytomella* beweist. Man hat dann den Eindruck, dass ihr Kern eine doppelte Constitution zeigt, wie wenn ein Kern im andern eingeschachtelt wäre.

Dieser merkwürdige Kerntypus scheint nicht selten, denn ich habe ihn bereits bei der *Amoeba diplomitotica* und einem *Bodo* vom Typus des *Saltans* beobachtet; wahrscheinlich findet er sich noch bei vielen anderen Protozoen. Eine solche Struktur erscheint mir sehr bedeutsam, weil sie die Doppelkernigkeit der Protozoen characterisiert.

GEISSELN.

Die Zahl der Geisseln der *Polytomella* beträgt in der Regel vier und sie entspringen von ebensovielen Basalkörperchen, welche kreuzweise am Vorderende des Körpers, an der Grenze zwischen diesem und dem Rüssel, liegen, wobei der Rand des letzteren von den Geisseln durchsetzt wird. Vier zarte und gewöhnlich wenig deutliche Rhizoplastfasern vermitteln die Verbindung der Basalkörperchen mit dem Kerne. Die Geisseln sind gleich lang, nach vorn gerichtet, ca. 22 μ lang und von homogener Struktur.

PULSIERENDE VACUOLEN.

Die *Polytomella agilis* zeigt zwei pulsierende Vacuolen, welche nebeneinander am Vorderende des Körpers gelegen sind und zwar zu beiden Seiten der Mittellinie dicht hinter dem Rostellum. Sie pulsieren abwechselnd in kurzen Zwischenräumen und überschreiten auch bei vollständiger Füllung den Durchmesses von 2—3 μ nicht.

ROSTELLUM.

Das Rostellum der *Polytomella* hat die Form eines durchsichtigen membranösen Kugelabschnittes, welcher dem Vorderende des Flagellaten angefügt ist. Seine Form wechselt beträchtlich, indem es sich bald vorspringend, bald abgeflacht präsentiert; in der regelmässigsten Form beträgt

BIOLOJIA.

O movimento de *Polytomella agilis*, graças á ação conjunta dos quatro flajelos que possue, é extremamente vivo, rapido e variavel ; ora o protozoario se desloca em linha réta, ora mais frequentemente com pequenas digressões para um lado ou para outro, mudando a cada momento de rumo. Emquanto se desloca o flajelado vibra quazi constantemente e gira sobre seu eixo lonjitudinal.

Curiozo fato se observa nas culturas já um pouco velhas e com certa tendencia ao encistamento, quando examinadas em gota pendente. Nota-se, então, que o flajelado depois de intensa serie de movimentos, se fixa pelo rostrilho, por algum tempo, á laminula por uma especie de tigmotropismo, e aí executa em torno de seu eixo, uma serie de rapidissimos movimentos rotativos, que interrompe subitamente, ao cabo de algum tempo abandona o ponto a que se fixava e segue em direção qualquer, para mais adiante reproduzir o mesmo fato. Embóra este fenomeno seja observado nos periodos de preencistamento do flajelado, é dificil dizer qual a relação que existe entre um e outro.

Durante o movimento livre não se nota alteração alguma na fórma do protozoario ; quando, porem, se fixa pelo rostrilho á laminula para executar os movimentos acima referidos, ás vezes seu contorno transverso, normalmente circular, aparece, em seção, com a fórma de quadrangulo, irregular, de lados arredondados.

A alimentação da politomela processa-se excluzivamente por via osmotica, porquanto nenhuma abertura bucal, nem tão pouco vacuolos alimentares se notam no protozoario ; muito pouco rezistente ás influencias termicas é o flajelado ; já a 45° cessam seus movimentos, morrendo elle se esta temperatura atúa prolongadamente ou, em pouco tempo, se é elevada a 50°.

A luz não parece influenciar prejudicalmente o protozoario, cujas condições visein Durchmesser ca. 2 μ und seine grösste Breite nicht mehr als 4 μ. Im Innern desselben defindet sich kein Organ, während es an seiner Peripherie die Geisseln durchtreten lässt, welche, wie bereits angegeben, dicht unter demselben entspringen.

BIOLOGIE.

Die Bewegung der *Polytomella agilis* ist in Folge der vier Geisseln, welche sie besitzt, äusserst lebhaft, beschleunigt und wechselvoll ; bald verschiebt sich der Organismus in gerader Linie, bald und noch öfters mit kleinen Abweichungen nach der einen oder anderen Seite, indem er jeden Augenblick seine Richtung ändert. Während der Bewegung vibriert die Geissel fast beständig und dreht sich um ihre Längsaxe.

In alten Kulturen, die einige Tendenz zur Incystierung zeigen, beobachtet man im hängenden Tropfen ein merkwürdiges Faktum ; man sieht nämlich, wie das Flagellat nach einer Reihe von intensiven Bewegungen sich für einige Zeit mit dem Rostellum am Deckglas fixiert (durch eine Art Tygmotropismus) und hier eine Reihe von äusserst raschen Drehbewegungen um seine eigene Axe ausführt ; nach einiger Zeit unterbricht er dieselben plötzlich, verlässt seinen Fixationspunkt und bewegt sich in einer beliebigen Richtung, woselbst sich dieselbe Erscheinung wiederholt. Obwohl man diesen Vorgang in der Periode vor der Incystierung beobachtet, ist es schwierig die Beziehungen zu erklären, welche zwischen den beiden bestehen. Während der freien Bewegungen bemerkt man keine Veränderung der Form des Protozoen ; wenn er sich aber mit dem Rüssel am Deckglas fixiert, um die beschriebenen Bewegungen auszuführen, erscheint er in seinem Querschnitt, der in der Regel rund ist, manchmal in Form eines unregelmässigen Vierecks mit abgerundeten Seiten.

Die Ernährung der *Polytomella* findet ausschliesslich auf osmotischen Wegen statt, da man an derselben weder eine Mundöffnung, noch Nahrungsvakuolen

tais se mantem as mesmas, quer seja exposto ou abrigado della.

O oxijenio é um elemento essencial ao flajelado que morre rapidamente quando delle privado. Nos preparados a fresco, entre lamina e laminula, é nas bordas e em torno ás bolhas de ar que os flajelados se acumulam, daí se movendo com toda a rapidez, ao passo que sucumbem, nos pontos privados de ar, ao cabo de muito pouco tempo.

As cores vitais, o *Neutralrot*, o azul de metilenio etc. não têm influencia sobre o protoplasma ou o nucleo do protozorio quando vivo. Nelle só as granulações do protoplasma se córam e quando a coloração invade a celula é sinal de que esta perdeu a vitalidade.

Os venenos celulares atúam muito violentamente sobre o flajelado; a saponina mata-o quazi instantaneamente, a bile, o oleato e o taurocolato de sodio dissolvem-n'o rapidamente, não deixando intatas senão as granulações do protoplasma. Nenhum vestijio de membrana pode ser visto como reziduo dos flajelados dissolvidos pelos venenos.

DIVIZÃO.

A *Polytomella*, não fazendo exeção aos demais flajelados, se divide lonjitudinalmente. Os fenomenos de divizão têm inicio no nucleo e só quando neste, as fazes já vão um tanto adiantadas é que começa a segmentação do protoplasma. A divizão nuclear da *Polytomella*, incontestavelmente a parte mais interessante do processo de segmentação, dá-se por mitoze, ou melhor, por processo de dupla mitoze em que tomam parte independente, de um lado as porções de cromatina periférica, e de outro o cariozoma sob a ação diretriz comum do centriolo, funcionando como centrozomio de um metazoario.

O carateristico da dupla mitoze é a constituição de cromozomios cariozomicos e

erkennt. Das Tier ist gegen thermische Einflüsse wenig resistent; schon bei 45° hören die Bewegungen auf, wenn diese Temperatur längere Zeit einwirkt; steigt sie auf 50°, so erfolgt dasselbe sehr bald. Das Licht scheint keinen nachteiligen Einfluss zu haben, da die Lebenserscheinungen sich nicht ändern, wenn es demselben ausgesetzt oder im Dunkel gehalten wird.

Der Sauerstoff ist für diesen Organismus ein notwendiges Element, da er bei Mangel desselben rasch abstirbt. In Deckglaspräparaten häufen sich die Individuen an den Rändern und um die Luftblasen an, wobei sie sich mit voller Geschwindigkeit bewegen, während sie an den Punkten, wo sie der Luft beraubt sind, nach kurzer Zeit absterben.

Die zur Vitalfärbung benutzten Farbstoffe: Neutralrot, Methylenblau etc. haben während des Lebens keinen Einfluss auf Protoplasma und Kern. Es färben sich dann nur die Granula des Protoplasmas und wenn die Färbung die Zelle selbst erreicht, ist es ein Zeichen des Absterbens.

Die Zellgifte haben auf den Flagellaten eine sehr heftige Wirkung; Saponin tötet ihn fast augenblicklich, Galle, ölsaures und taurocholsaures Natron lösen ihn rasch auf und lassen nur die Protoplasmagranula unverzehrt. Nach der Anflösung durch die Gifte bleibt keine Spur einer Membran sichtbar.

TEILUNG.

Die *Polytomella* bildet keine Ausnahme unter den Flagellaten und teilt sich längsweise. Die Teilungserscheinungen beginnen am Kerne und erst, wenn sie an diesem einigermassen vorgerückt sind, beginnt die Segmentation des Protoplasmas.

Die Kernteilung der *Polytomella* bildet ohne Zweifel den interessantesten Teil des Teilungspriozesses; sie erfolgt durch Mitose oder richtiger durch einen Vorgang doppelter Mitose, an dem einerseits die peripherischen Chromatinteile, andererseits das Caryosom, von einandern unabhängig, aber unter gemeinsamen Einfluss des Cen-

periféricos que se orientam uns apoz outros em direção aos polos de um mesmo fuzo.

O primeiro indicio da divizão nuclear na *Polytomella* manifesta-se pela dispozição irradiante, em torno ao cariozoma, que tomam as pequenas massas de cromatina, aplicadas á porção interna da membrana e que aparecem então muito nitidas, podendo-se contar até 12 pequenos bastonetes (Est. 3, Fig. 2). Logo em seguida se observa a fragmentação do cariozoma em pequenos bastonetes, cujo numero é dificil de apreciar e que, reunidos á porção de cromatina periférica, formam, no interior do nucleo, de que então dezaparece a membrana, um agrupamento unico onde se não pode distinguir quais os elementos de uma, quais os de outra orijem. (Est. 3, Fig. 2).

Em faze ulterior do processo, os cromozomios orijinais da divizão do cariozoma aparecem com dispozição transversal em filas paralelas, perpendicularmente ás quais vão procurando se orientar os cromozomios perifericos (Est. 3, Fig. 4). Até esta faze nenhum indicio se tem da formação de fuzo; a seguir, porém, aparece constituido um fuzo muito nitido, cujo eixo é formado pelos cromozomios cariozomicos dispostos sob a fórma de pequena faixa, em torno á qual, na parte média, se dispõem constituindo pequena placa equatorial, os cromozomios perifericos ligados aos polos do fuzo por delicados filamentos acromaticos (Est. 3, Fig. 5).

Nestes primeiros periodos do processo de divizão o centriolo é pouco perceptivel e não se póde verificar com clareza as transformações que elle sofre; pelo que, porém, se observa, a seguir, não fica elle inativo e tambem se divide, muito provavelmente por mitoze.

Constitue um periodo mais adiantado do processo de segmentação do flajelado, a divizão da faixa cariozomica da faze precedente, pelo meio, perpendicularmente ao eixo e o afastamento das duas porções que se vão colocar nos pólos do fuzo sob a fór-

triols, teilnehmen, indem letzteres die Funktion des Centrosoms der Metozoen übernimmt.

Die doppelte Mitose kennzeichnet sich durch die Bildung von peripherischen und Caryosom-Chromosomen, welche sich hinter einander anordnen, in der Richtung nach den Polen derselben Spindel; die ersten Anzeichen der Kernteilung äussern sich bei der *Polytomella* durch die strahlige Anordnung, welche die kleinen, der Membran inwendig anliegenden, Chromosomen um das Caryosom annehmen; sie erscheinen dann sehr deutlich und man kann bis zu zwölf kleine Stäbchen zählen (Tafel 3, Fig. 2). Kurz darauf beobachtet man eine Fragmentation des Caryosoms in kleine Stäbchen, deren Anzahl schwer zu erkennen ist; in Verbindung mit derjenigen der peripherischen Chromatinportion, bilden sie im Innern des Kernes, dessem Membran jetzt verschwindet, eine gemeinsame Gruppe, in welcher die Elemente verschiedenen Ursprungs sich nicht unterscheiden lassen. (Tafel 3, Fig. 3).

Dagegen erscheinen bei einer weiteren Phase, die bei der Teilung des Caryosoms gebildeten Chromosomen in tranversaler, von parallelen Reihen gebildeter Anordnung, während sich die peripheren Chromosomen senkrecht zu denselben zu ordnen suchen (Tafel 3, Fig. 4).

Bis zu dieser Phase findet man keine Anzeichen einer Spindelbildung; es folgt nun aber die Bildung einer deutlichen Spindel, deren Axe durch Caryosom-Chromosomen gebildt wird, welche in der Form eines kleinen Bandes geordnet sind, um welches in der Mitte sich die peripherischen Chromosomen zu einer kleinen Aequatorialplatte anordnen, welche mit den Polen der Spindel durch zarte achromatische Fäden verbunden ist (Tafel 3, Fig. 5).

Bei diesen ersten Phasen der Kernteillung ist das Centriol schwer zu erkennen und seine Veränderungen lassen sich nicht deutlich verfolgen; doch zeigen die späteren Beobachtungen, dass es nicht untätig bleibt, sondern sich, wahrscheinlich amitotisch, teilt.

ma de dois pequenos cones, separados entre si por um filamento mais escuro, que é o filamento de união dos centriolos. Nenhuma alteração se nota na placa de cromozomios perifericos (Est. 3, Fig. 6). Os pequenos cones de natureza cariozomica, colocados nos pólos do fuzo, não raro já neste periodo da divizão, perdem essa fórma e aprezentam-se então com o aspéto de pequenas placas polares; geralmente, porém, é esta transformação mais tardía. (Est. 3, Fig. 7).

Percorridas as fazes precedentes, o fuzo que até aqui conservou pequenas dimensões, se alonga bastante, estreitando-se proporcionalmente; as extremidades continuam a ser ocupadas pelas placas ou cones de cromozomios do cariozoma entre as quais se estendem paralelamente, numerozos filamentos acromaticos onde aparecem, então, distribuidos os cromozomios perifericos que formavam a placa equatorial das fazes precedentemente descritas. Neste periodo os centriolos aparecem bem viziveis colocados nas placas polares e continuam ligados um ao outro pelo filamento de união, apenas mais alongados que nas fazes precedentes (Est. 3, Fig. 8).

Em seguida começam os cromozomios perifericos a se dirijir para os pólos do fuzo, junto aos quais, em opozição á placa cariozomica, formam, de cada lado, pequeno agrupamento conico e apenas separado della por pequena zona clara, atravessada por filamentos acromaticos.

Com esta orientação diverjente dos cromozomios perifericos coincide o estreitamento, na parte central do fuzo da faze precedente cujos extremos, afinal, só ficam ligados pelo filamento de união dos centriolos (Est. 3, Fig. 9).

Ao mesmo tempo que se dá o alongamento do fuzo nas fazes precedentes, observam-se os primeiros sinais de tendencia do protoplasma á segmentação e que se manifestam pelo alargamento transversal do flajelado, não tardando a aparecer um pequeno entalhe na porção posterior delle (Est. 3, Fig. 10).

Eine spätere Phase des Prozesses bildet die Teilung des Chromosomenbandes der eben beschriebenen Phase, welche in der Mitte und senkrecht auf seine Axe erfolgt, und das Abrücken der beiden Teile, welche sich nach den Polen der Spindel begeben; sie zeigen dabei die Form zweier kleiner Kegel, welche durch eine dunklere Faser getrennt sind, die der Verbindungsfaser der Centriolen entspricht. An der peripheren Chromosomenplatte ersieht man keine Veränderung (Tafel 3, Fig. 6). Schon in dieser Teilungsphase verlieren die an den Polen der Spindel gelegenen Kegel, die von Caryosomen abstammen, manchmal ihre Form und bieten dann das Bild kleiner Polplatten; gewöhnlich findet aber diese Veränderung erst später statt (Tafel 3, Fig. 7). Nach Vollendung der vorhergehenden Phasen streckt sich die bis dahin kleine Spindel beträchtlich und verschmälert sich dementsprechend; ihre Enden werden noch immer durch die Platten oder Kegel der Chromosomen des Caryosoms eingenommen, zwischen welchen zahlreiche parallele achromatische Fäden verlaufen, auf welchen die peripherischen Chromosomen, welche die eben beschriebene Aequatorialplatte bildeten, verteilt erscheinen. In diesem Augenblick erscheinen die Centriolen deutlich an den Polarplatten lokalisiert und noch immer verbunden durch die Faser, welche nur etwas verdünnt erscheint (Tafel 3, Fig. 8).

Im weiteren Verlaufe begeben sich die peripherischen Chromosomen nach den Polen der Spindel und bilden in der Nähe derselben, der Chromosomplatte entgegengesetzt, auf beiden Seiten eine kleine kegelförmige Gruppe, welche von denselben nur durch eine kleine, von achromatischen Fasern durchsetzte Zone getrennt ist. Mit dieser divergierenden Anordnung der peripheren Chromosomen coincidiert eine centrale Einschnürung der Spindel der vorigen Phase, so dass ihre Enden zuletzt nur durch die Verbindungsfaser der Centriolen vereinigt erscheinen (Tafel 3, Fig. 9).

Gleichzeitig mit der Streckung der

Adiantando-se o processo de divizão, rompe-se o filamento de união dos centriolos e, de cada lado do protozoario, aparecem, então, izoladas as duas porções rezultantes da divizão sucessiva dos elementos do cariozoma e da cromatina periférica, tendo cada uma o seu centriolo e possuindo metade do filamento de união. E' cada vez mais acentuada a divizão do filamento do protoplasma (Est. 3, Fig. 11).

Começam então, daqui por deante, em cada um dos duplos grupos de cariozomas orijinais do nucleo primitivo, os fenomenos de reconstituição nuclear dos dois futuros flajelados, provenientes da divizão do prozoario primitivo. Observa-se, então, que, aos poucos, do cone de cromozomios perifericos se vão desprendendo bastonetes que passam para a pequena zona de separação dos dois grupos de cromozomios (perifericos e cariozomicos) e aí se dispõem sob a fórma de pequena corôa em torno dos elementos de natureza cariozomica. Geralmente nesta faze a divizão protoplasmica já é muito acentuada não restando, afinal senão uma pequena ponte ligando os dois flajelados (Est. 3, Fig. 12 e 13).

Em todo o periodo de divizão até aqui, o flajelado não aprezenta a menor diminuição de mobilidade; é na mais constante movimentação que o processo evolve até o seu termo, notando-se mesmo, nas ultimas fazes, o esforço com que os novos flajelados procuram libertar-se um do outro, por meio de movimentos subitos e muito ativos até que, finalmente, conseguem romper os ultimos liames e ficam livres. Os flajelados recentemente divididos aprezentam, tambem, movimentos muito vivos graças aos dois flajelos com que cada um delles fica munido (Est. 3, Fig. 14).

Uma vez separadas as celulas, nellas se acentúa a reconstituição nuclear. A porção proveniente do cariozoma do nucleo primitivo e que dará orijem a novo cariozoma aumenta vizivelmente de volume, vai-se tornando arrendondada e compacta ao mesmo tempo que os cromozomios perifericos co-

Spindel während der vorhergehenden Phasen, beobachtet man die ersten Anzeichen einer Teilungstendenz am Protoplasma, welche sich durch eine queere Verbreiterung des Flagellaten äussern, wobei bald ein kleiner Einschnitt an den hinteren Portionen desselben auftrit (Tafel 3, Fig. 10).

Beim Fortschreiten des Teilungsprozesses zerreisst die Verbindungsfaser der Centriolen und auf jeder Seite des Protozoen erscheinen nun getrennt die beiden Teile, welche aus der successiven Teilung der Elemente des Caryosoms und des peripheren Chromatins hervorgehen, indem jeder sein Centriol und die Hälfte der Verbindungsfaser aufweist; dabei akzentuiert sich die Teilung des Protoplasmas immer mehr (Tafel 3, Fig. 10—13). In den beiden Gruppen der Chromosomen, welche aus dem ursprünglichen Kern hervorgehen, beginnen nun die Erscheinungen der Kernrekonstitution der beiden, von den ursprünglichen Organismus abstammenden, zukünftigen Tiere. Man sieht dann wie allmählig vom Kegel der peripheren Chromosomen sich Stäbchen ablösen und in die schmale Trennungszone der beiden Gruppen von Chromosomen (des Caryosoms und der Peripherie) übertreten und sich dort in Form eines kleinen Kranzes um die Elemente, die vom Caryosom abstammen, anordnen. Gewöhnlich ist in dieser Phase die Teilung des Protoplasmas schon sehr ausgesprochen und nur eine kleine Verbindungsbrücke zwischen den beiden Flagellaten erkennbar (Tafel 3, Fig. 12 u. 13).

Während der ganzen Teilung bis zu dieser Phase, zeigt die *Polytomella* keine Verminderung der Beweglichkeit; der Prozess verläuft bis zum Ende während ununterbrochener Bewegungen und man bemerkt sogar zum Schlusse die Anstrengungen, welche die neue gebildeten Individuen machen, um sich durch rasche und kräftige Bewegungen von einander zu trennen, bis es ihnen schliesslich gelingt, die letzten Verbindungen zu zerreissen und frei zu werden. Nach der Teilung zeigen sie gleichfalls sehr leblafte Bewegungen mit

meçam, aos poucos, a cercal-o, ao passo que, o cone, primitivamente por elles formados diminue vizivelmente de tamanho com a saída dos elementos que o constituiam (Est. 3, Fig. 15).

Não tarda que esse cone dezapareça por completo e os elementos que o constituiam, apareçam então dispostos regularmente na periferia do novo nucleo junto a nova membrana que então se forma para limitar o nucleo. A esse tempo o cariozoma se torna completamente redondo e o nucleo em nada difére do tipo normal; sómente se acha colocado excentricamente no flajelado (Est. 3, Fig. 16). Não tarda, ainda que elle venha tomar a sua pozição normal no centro da celula e que deste módo terminem os fenomenos nucleares do processo de divizão.

Sucede, agora, a multiplicação dos flajelos que se parece dar pela divizão direta dos dois corpusculos bazais do protozoario, ficando um com um flajelo e dando o outro orijem a um elemento semelhante. Desta fórma, em breve, tem o protozoario adquirido o numero normal de organs locomotores e, assim, com a reconstituição do nucleo e rejeneração dos flajelos termina o processo de divizão do flajelado.

COPULAÇÃO.

A copulação dos flajelados não é fenomeno muito comumente observado, em muitas fórmas; naquellas mesmas em que em maior abundancia proliferam nas culturas é ella desconhecida.

A *Polytomella agilis*, não fazendo excepção á regra, só muito raramente entra em copulação. O fenomeno só é observado nas culturas já antigas e muito abundantes; ainda nestas, o numero de fórmas que entra em copulação nunca é muito grande o que dificulta sobremodo a pesquiza dos diferentes estádios nos preparados fixados nos quais sómente é possivel observar as particularidades ultimas do processo sexual. Os elementos que entram em copulação não aprezentam diferenças sexuais perceptiveis

Hülfe der beiden Geisseln, welche jedem von ihnen verbleiben (Tafel 3, Fig. 14).

Nach Trennung der Zellen zeigt sich die Rekonstitution des Kernes immer mehr. Der Anteil, welcher von dem Caryosom des primitiven Kernes abstammt und den Ursprung des neuen Caryosoms bildet, wächst sichtlich an Umfang, rundet sich ab und verdichtet sich, während die peripheren Chromosomen ihn allmählig umgeben und der ursprünglich von ihnen gebildete Kegel durch Auswanderung seine Bestandteile sichtlich abnimmt (Tafel 3, Fig. 15).

Bald verschwindet er vollständig und seine Bestandteile erscheinen dann regelmässig geordnet an der Peripherie des neuen Kernes und im Innern der neuen begrenzenden Membran. Jetzt ist auch das Caryosom vollständig rund geworden und der Kern weicht vom normalen Typus nur dadurch ab, dass er excentrisch liegt (Tafel 3, Fig. 16). Doch nimmt er bald darauf seine normale Stellung im Centrum der Zelle ein, womit die sich am Kerne abspielenden Erscheinungen des Teilungsprozesses vollendet sind.

Es findet hierauf die Vermehrung der Geisseln statt, anscheinend durch direkte Teilung der beiden Basalkörperchen, wobei das eine die Geisseln behält und das andere eine neue erzeugt, sodass bald darauf der Organismus die Normalzahl von Bewegungsorganen erhält und dergestalt mit Rekonstitution des Kernes und Regeneration der Geisseln der Teilungsprazess zum Abschluss kömmt.

KOPULATION.

Die Kopulation der Flagellaten ist keine häufige Erscheinung und ist bei vielen Formen — auch solchen, die sich in den Kulturen sehr stark vermehren — nicht bekannt. Auch hier bildet die *Polytomella agilis* keine Ausnahme, indem sie nur selten eine Kopulation eingeht. Die Erscheinung wird nur bei alten und sehr reichlichen Kulturen beobachtet und selbst dann ist die Zahl der kopulierenden Paare nie sehr

entre si, são porém, em geral, menores que as demais fórmas das culturas. E' provavel, até certo ponto, que esta diferença de tamanho, corresponda a um estado de depressão da celula, o que muito déve auxiliar as manifestações sexuais do protozoario.

A parte grosseira do fenomeno póde ser facilmente acompanhada ao microscopio ; quanto, porém, ás alterações nucleares de que ella se segue, só em preparações fixadas e córadas podem ser observadas em seus intimos pormenores.

Estudada em gota pendente a copulação aprezenta as seguintes fazes : A principio, observa-se que certo numero de flajelados da mesma cultura como a se procurarem com certa insistencia ; tocam-se e afastam-se a cada momento uns dos outros, até que, depois de por algum tempo repetirem esse manejo, dois delles se encontrando nas condições necessarias á realização da copulação se fixam um ao outro, pelas porções laterais anteriores, tomando o aspéto de uma fórma de divizão em periodo adiantado, quando os flajelados já procuram separar-se um do outro. Ao contrario, porém, do que acontece na divizão, aqui o que se observa é cada vez mais intima e igual fuzão dos protozoarios ; rapidamente a figura de copulação toma a fórma de elipse larga e curta, em cujo eixo maior, ao começo, ainda se observam vestijios da separação entre os flajelados, que não tardam a dezaparecer. Fundindo-se afinal por completo os gametas, o zigoto aprezenta-se com a fórma esférica.

Durante as fazes da copulação anteriormente referidas, pouco a pouco vai diminuindo a mobilidade até dezaparecer por compléto, algum tempo apoz a constituição do zigoto, quando dezaparecem os flajelos, tornando-se a celula imovel.

Depois que os flajelados, por completo, se têm fundido, observa-se o aparecimento em torno ao zigoto de uma delgada membrana que aos poucos se espessa, ocorrendo então o encistamento delle. A parte do ato sexual, acima descrita, é aquella que a

gross, wodurch die Erforschung der verschiedenen Stadien an fixierten Präparaten (bei welchen allein die feineren Einzelheiten erkannt werden können) sich ausserordentlich erschwert. Die kopulierenden Individuen zeigen keine Geschlechtsunterchiede, sind jedoch im Allgemeinen kleiner als die übrigen Kulturformen. Es ist bis zu einem gewissen Grade wahrscheinlich, dass ein solcher Grössenunterschied einem Depressionszustande der Zelle entspricht, welcher zum Auftreten der Grschlechtserscheinungen bei den Protozoen besonders beitragen soll.

Die gröberen Erscheinungen können leicht unter dem Mikroskope verfolgt werden ; dagegen lassen sich die Veränderungen an den Kernen in ihren feinsten Einzelheiten nur an fixierten und gefärbten Präparaten erkennen.

Im hängenden Tropfen studiert, beobachtet man, dass in derselben Kultur eine Anzahl Flagellaten sich mit einer gewissen Beständigkeit aufzusuchen scheinen ; sie berühren sich jeden Augenblick und trennen sich wieder, bis, nach öfterer Wiederholung dieses Spieles, zwei derselben die notwendigen Bedingungen zur Realisierung der Kopulation erreichen und sich mit einander durch die seitlichen Partien der Vorderenden vereinigen und so das Bild einer vorgeschrittenen Teilungsform bieten, wenn die Flagellaten von einander loszukommen suchen. Im Gegensatz dazu beobachtet man jedoch eine immer innigere und gleichmässigere Verschmelzung der Protozoen ; bald nimmt das Paar eine kurze und dicke Eiform an, in deren Längsaxe anfangs noch Spuren der Trennung erkennbar sind, welche aber auch baldigst verschwinden ; indem so endlich die Gameten vollständig verschmelzen, zeigt der Zygote eine kugelige Form.

Während der soeben beschriebenen Kopulationsphasen nimmt die Beweglichkeit der Individuen allmählig ab und hört schliesslich einige Zeit nach Bildung der Zygoten, vollständig auf, indem die Geisseln verschwinden, wodurch die Zelle unbeweglich wird.

observação permite verificar nas preparações a fresco. As fazes nucleares do fenomeno, essas só em material fixado e córado podem ser pesquizadas em seus delicados pormenores.

Aqui tambem a *Polytomella agilis*, não fazendo exceção aos demais flajelados quando entram em copulação, aprezenta como fenomenos nucleares mais caracteristicos reduções que precedem a fuzão dos nucleos.

Tanto quanto a nossa observação permite afirmar, a redução nuclear parece efetuar-se por um mecanismo de divizão heteropolar, com a formação de fuzo com dezigual distribuição de cromozomios de modo bastante semelhante ao que Dobell (Quart. Journ. of Micr. Sc. Vol. 52, pag. 1) descreve na *Copromonas subtilis*.

A redução começa, ora em fazes muito adiantadas da copulação, ora nos periodos iniciais da fuzão celular e tambem não ocorre ao mesmo tempo, em ambos os nucleos.

Tambem na *Polytomella agilis* como sucede no *Copromonas subtilis* só conseguimos observar e emissão de um corpusculo de redução que aparece ligado por um filamento acromatico ao resto do nucleo, porém que não tarda a se separar delle e a dezaparecer no protoplasma da celula. Os nucleos reduzidos se aproximam, então, um do outro e não demoram a se fundir um com o outro intimamente, terminando-se assim as fazes nucleares da copulação de que as Fig. 17—20 da Est. 3 exemplificam algumas das fazes.

ENCISTAMENTO.

O aparecimento de cistos nas culturas da *Polytomella* é muito precoce. Começam a ser vistos desde os primeiros dias de cultura, quando ainda os flajelados proliferam abundantemente, e nas melhores condições de nutrição do meio, não são, portanto, devidos a condições desvantajozas deste, mas, antes, á necessidade e um pe-

Nach vollständiger Verschmelzung der Paare, bemerkt man um die Zygoten eine dünne Membran, die sich allmählich verdickt und zur Incystierung führt. Meine Beschreibung entspricht demjenigen Anteile des Sexualaktes, der sich an frischen Präparaten verfolgen lässt. Die Erscheinungen an den Kernen können in ihren feineren Einzelheiten nur an fixiertem und gefärbtem Materiale studiert werden. Hier zeigt die *Polytomella agilis*, ebenfalls in Ueberstimmung mit der Kopulation anderer Flagellaten, als besonders charakterische Erscheinung eine Kernreduktion als Vorläufer der Kernverschmelzung.

Soweit ich aus meinen Beobachtungen schliessen darf, erfolgt die Kernreduktion durch heteropolaren Teilungsmechanismus, unter Bildung einer Spindel mit ungleicher Chromosomenverteilung, ähnlich wie sie Dobell bei der *Copromonas subtilis* beschrieb (Dobell, *Quart. Journ. of Mikrosc. Sc.*, vol. 25, pag. 1).

Die Reduktion beginnt bald in sehr vorgeschrittenen Phasen der Kopulation, bald in den Anfangsperioden der Zellfusion und findet auch in den beiden Kernen nicht gleichzeitig statt.

Wie es bei der *Copromonas subtilis* der Fall war, so konnte ich auch bei der *Polytomella agilis* nur die Ausstossung eines Reduktionskörperchens beobachten, welches durch eine achromatische Faser mit dem Reste des Kernes verbunden erscheint, sich jedoch bald von demselben trennt und im Protoplasma der Zelle verschwindet.

Es nähern sich dann die reducierten Kerne, um bald vollständig zu verschmelzen; dies bildet den Abschluss der Kernerscheinungen bei der Kopulation, von welchem die Fig. 17-20 der Tafel 3 einige Beispiele geben.

INZYSTIERUNG.

Die Erscheinung von Zysten in den Kulturen der *Polytomella* ist eine sehr frühzeitige; sie fangen schon in den ersten Tagen an aufzutreten, wenn die Flagellaten sich in den Kulturen noch reichlich

riodo de repouzo apoz uma faze das mais favoraveis condições vitais.

Os flajelados com tendencia ao encistamento se caraterizam pelo aumento progressivo dos microgranulos do protoplasma que, aos poucos, vão enchendo todo o corpo do flajelado e encobrindo quazi o nucleo. Nota-se, então, nestas fórmas grande tendencia aos movimentos tigmotropicos anteriormente descritos. (Est. 3, Fig. 21). Aos poucos, o flajelado vai perdendo a fórma ovoidal e tornando-se eliptico ; os flajelados desprendem-se uns apoz outros, encontrando-se facilmente fórmas com 1, 2 ou 3 desses organs. Começa, já, então a observarem-se vestijios de delgada membrana cercando a celula. (Est. 3, Fig. 22). Em periodo mais adiantado dezaparecem por completo os flajelos, o flajelado toma uma fórma quazi regularmente esférica, o nucleo então quazi dezaparece sob a quantidade de microgranulos agóra acumulados uns juntos aos outros. A membrana torna-se mais nitida em volta da celula.

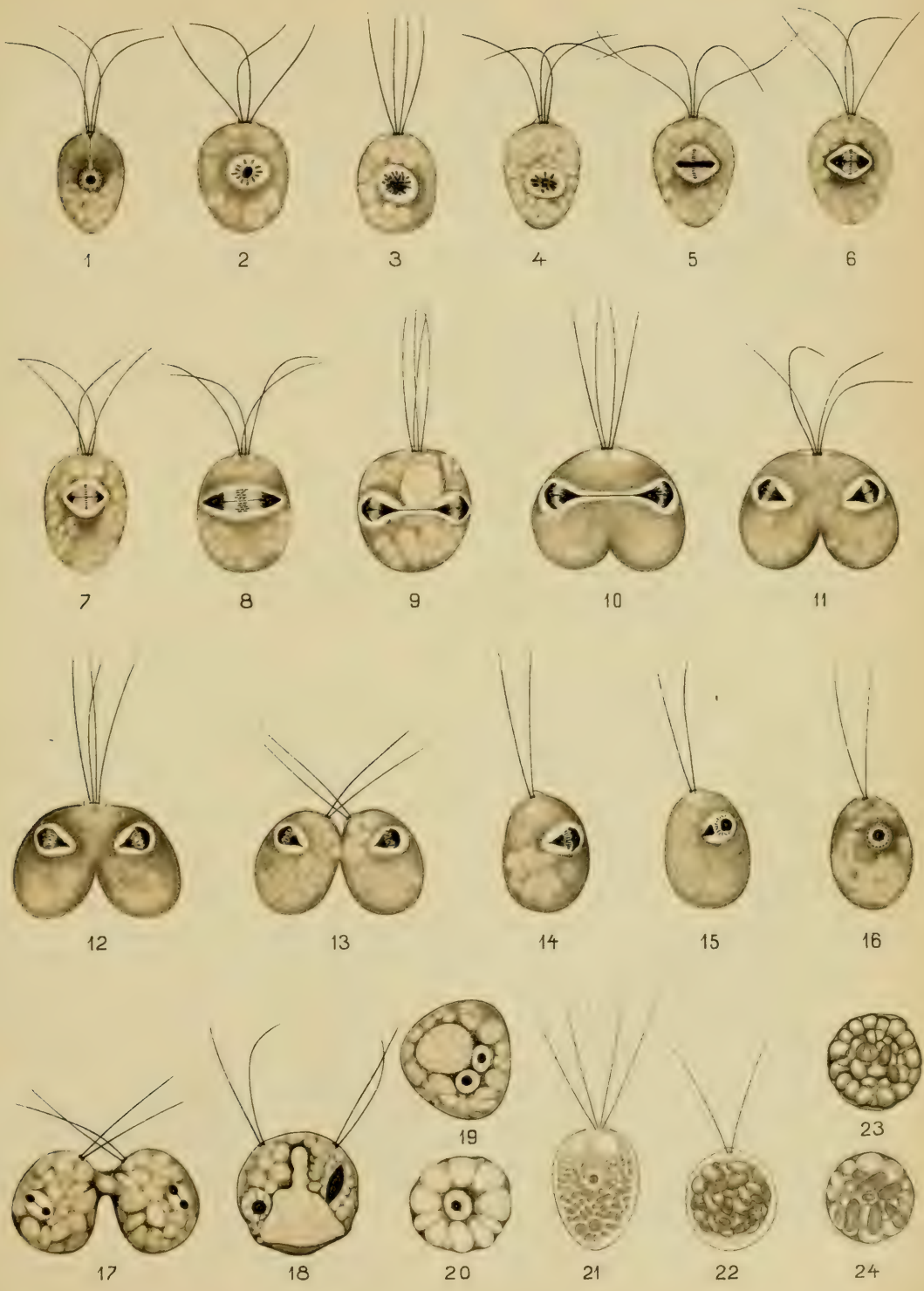
Não tarda o cisto a ficar completamente constituido ; aprezenta, então, uma fórma muito regularmente circular e é cercado por uma membrana muito nitida de duplo contorno e seu interior é ocupado pelo nucleo do protozoario dificilmente perceptivel sob os microgranulos dispostos uns ao lado dos outros. O cisto méde, então, 8 μ de diametro, em média, e tem um colorido amarelo claro. (Est. 3, Fig. 23 : cisto apoz fixação) e 24 (cisto visto a fresco).

Sobre a evolução do protozoario neste cisto nada podemos dizer por emquanto, apezar das tentativas para observal-o, nenhum sucesso lográmos alcançar. E' certo, porém, que grande numero destes cistos quando transportados para novo meio de cultura não dão lugar á saída de novo flajelado, elles dejeneram os microgranulos se fundem uns com os outros em massas irregulares que saem do cisto com a rutura da membrana em um ponto qualquer.

Os microgranulos que fóra do cisto tão facilmente se córam, uma vez cercados

vermehren und diese noch die besten Ernährungsbedingungen bieten. Sie sind also nicht eine Folge ungünstiger Bedingungen, sondern eher der Notwendigkeit einer Ruheperiode nach einer Phase günstiger Lebensbedingungen.

Die Tendenz zur Inzystierung kennzeichnet sich bei den Flagellaten durch allmähliche Zunahme der Mikrogranula im Protoplasma, welche allmählich den ganzen Zellleib erfüllen und den Kern fast verdecken. Man bemerkt alsdann an diesen Formen eine grosse Tendenz zu tygmotropischen Bewegungen, wie sie oben beschrieben wurden (Tafel 3, Fig. 21). Nach und nach verliert der Flagellat seine Eiform und wird länglich. Die Geisseln lösen sich successive ab, so dass man leicht Formen mit einer, zwei oder drei derselben findet. Es beginnt alsdann das Auftreten einer Andeutung einer dünnen Membran um die Zelle (Tafel 3, Fig. 22). In einem vorgerückteren Stadium sind die Geisseln völlig verschwunden und die Form ist fast regelmässig kugelig, während der Kern unter den angehäuften kleinen Körnern fast verschwindet. Die die Zelle umgebende Membran erscheint immer deutlicher. Bald wird die Zyste vollständig ausgebildet und zeigt alsdann eine regelmässig runde Form, von einer sehr deutlichen, doppelkonturierten Membran umgeben, während das Innere von dem Kerne eingenommen wird, der unter den aneinander gelagerten Mikrogranulis schwer erkennbar ist. Die Zyste misst dann 8 μ in mittlerem Durchmesser und zeigt eine hellgelbe Färbung. Ueber die Entwicklung des Protozoen in dieser Zyste kann ich nichts aussagen, da meine Versuche, sie zu beobachten, kein Resultat gaben ; es ist jedoch sicher, dass eine grosse Zahl dieser Zysten bei Uebertragung in neue Nährlösungen keine Flagellaten austreten lassen ; sie degenerieren und die Mikrogranula verschmelzen gegenseitig zu unregelmässigen Massen, welche durch Ruptur der Membran an einer beliebigen Stelle aus der Zyste austreten. Die Mikrogranula, welche sich ausserhalb der Zysten leicht färben lassen, widerstehen, nach-



CASTRO SILVA

da membrana completamente constituida, rezistem á influencia do iodo, do *Neutralrot*, do azul de metilenio etc. Tem-se mesmo completa certeza de que um cisto está definitivamente constituido pela rezistencia que oferece á penetração de tais substancias.

A membrana do cisto é extraordinariamente rezistente aos ajentes fizicos e quimicos. Não têm a menor influencia sobre ella, modificando-a ou dissolvendo-a, o aquecimento, o alcool, o éter, o cloroformio, o xilol, os acidos cloridrico, acetico e azotico, mesmo em forte concentração e o reativo de SCHWEITZER.

Os cistos provenientes da copulação distinguem-se dos precedentes, principalmente pelo menor numero de micrograuulos nelles existentes. Quanto á sua evolução ulterior nada podemos dizer por emquanto; nunca tivemos ocazião de observal-a.

DEJENERAÇÃO.

Nas culturas antigas do protozoario não raro se observa o aparecimento de fórmas de dejeneração atinjindo, tanto o protoplasma, como o nucleo. Uma dessas alterações mais frequentemente observada é o aparecimento de flajelados, aprezentando grande vacuolo não pulsatil, tomando todo o espaço entre o nucleo e a orijem dos flajelos. Outro indicio de degradação celular é o aparecimento de fórmas alongadas terminadas em ponta aguda e, nas quais, não raro, se manifestam divizões protoplasmicas deziguais e que geralmente são dificies de fixar e que tambem se córam irregularmente.

Tanto em uma, como em outra, destas fórmas de dejeneração se encontra muito comumente o nucleo fragmentado em dois pedaços colocados um ao lado do outro, ou um pouco separados, simulando uma fórma de conjugação, em periodo de fuzão nuclear.

dem sie von einer vollstänig ausgebildeten Membran umschlossen sind, dem Einfluss von Jod, Neutralrot, Metylenblau etc; man kann sogar aus der Resistenz, welche sich dem Eindringen dieser Substanzen bietet, die absolute Sicherheit der vollständigen Ausbildung der Zysten erhalten.

Die Zystenmembran ist gegen physikalische und chemische Agentien ausserordentlich resistent; Erhitzung, Alkohol, Aether, Chloroform, Xylol, Salz-, Essig- und Salpetersäure, selbst in starker Konzentration, und auch das Reagens von SCHWEIZER haben nicht den geringsten Einfluss auf dieselbe, weder im Sinne einer Veränderung, noch in demjenigen einer Auflösung.

Die Zysten, welche nach der Kopulation auftreten, unterscheiden sich von den anderen durch die kleinere Anzahl der darin enthaltenen Mikrogranula. Ueber ihre weitere Entwicklung kann ich nichts aussagen, da ich niemals Gelegenheit hatte, eine solche zu beobachten.

DEGENERATION.

In allen Kulturen der Protozoen beobachtet man nicht selten das Auftreten von Degenerationsformen, welche sowohl das Protoplasma, wie den Kern betreffen. Eine der häufigsten Veränderungen besteht im Auftreten von Flagellaten, welche eine grosse, nicht pulsierende Vakuole zeigen, die den ganzen Raum zwischen Kern und Ursprungstelle der Geisseln ausfüllt. Ein anderes Anzeichen der Zelldegeneration liegt im Vorkommen von verbreiterten Formen, die mit einer scharfen Spitze endigen und in welchen sich nicht selten ungleiche Protoplasmateilungen zeigen, die sich gewöhnlich schwer fixieren lassen und sich auch unregelmässig färben. Sowohl bei der einen, wie bei der anderen Degenerationsform findet man sehr häufig den Kern in zwei Fragmente zerfallen, welche neben einander oder etwas getrennt liegen und eine Konjungationsform in der Periode der Kernverschmelzung vortäuschen.

Notas dipterolojicas

PELO

Dr. Adolpho Lutz.

Dipterologische Notizen

VON

Dr. Adolph Lutz.

I.

«Habitat» e tempo de aparecimento da «Diatomineura longipennis Ricardo».

Debaixo do nome citado no titulo Miss RICARDO descreveu uma *pangonina* ainda não denominada; esta lembra na sua aparencia as especies do genero *Diclisa* SCHINER, mas não póde neste ser colocada por cauza da dispozição diferente das nervuras das azas. Comquanto difira consideravelmente no seu habito total das outras especies indijenas de *Diatomineura*, será preferivel conserval-a neste genero até que a constatação de outras especies parecidas indique a necessidade do estabelecimento de novo genero.

O exemplar descrito do British Museum provem do Estado do Espirito Santo; dous exemplares da minha coleção eram de procedencia desconhecida. Não se conhecendo outros, podia-se julgar que se tratava de especie rara, mas a experiencia mostra que as outras pangoninas em tempo e logar apropriado se acham quazi sempre em numero maior, ás vezes muito grande. Esta especie tambem não faz exceção, com rezulta do seguinte:

No principio de Julho de 1909 este

I.

Vorkommen und Flugzeit von Diotomineura longipennis Ricardo.

Unter dem in Titel erwähnten Namen hat Miss RICARDO eine bisher unbenannte Pangonine beschrieben, die zwar in ihrem Aeusseren sehr an Arten des Genus *Diclisa* SCHINER erinnert, aber wegen ihres abweichenden Flügelgeäders nicht in dasselbe gestellt werden kann. Trotzdem sie in ihrem gesammten Habitus von den anderen hiesigen Arten des Genus *Diatomineura* erheblich abweicht, wird sie doch am besten in demselben belassen, bis das Auffinden ähnlicher Arten das Abgrenzen einer neuen Gattung wünschenswert macht.

Das beschriebene Exemplar aus dem British Museum stammte aus dem Staate Espirito Santo; zwei Exemplare meiner Sammlung waren unbestimmter Herkunft. Da weitere nicht bekannt waren, konnte man die Species für selten halten, doch lehrt die Erfahrung an anderen Pangoninen, dass sie zur richtigen Zeit und am richtigen Orte fast stets in mehreren, oft in sehr zahlreichen Exemplaren erbeutet werden können. Hiervon macht auch diese Art keine Ausnahme, wie aus Folgendem ersichtlich ist:

Anfangs Juli 1909 erhielt Dr. Os-

Instituto, recebeu do Dr. GURGEL DO AMARAL uma pequena remessa de tabánidas, apanhados no fim de Julho em Alfenas (Sul de Minas). Ao lado de alguns exemplares de *Erephopsis sorbens* WIED. (especie comum, encontrada tambem no inverno em pequeno numero) esta só continha *D. longipennis*. Durante o mez de Julho obteve outras remessas chegando o numero de exemplares da mesma especie a mais de 30. Disto se póde concluir que esta mutuca é bastante frequente naquela zona.

O que chama especialmente a atenção é o tempo em que se observou, coincidindo com a maior intensidade do nosso inverno que costuma trazer uma diminuição consideravel dos insetos. E' verdade que a *Diatomineura tabanipennis* MACQ. já se observa neste mez, mas isto se dá geralmente no litoral mais quente, emquanto que a *Neopangonia pusilla* LUTZ é encontrada em São Paulo apenas no principio da estação fria. De mais, nesta zona durante o inverso só se encontram poucos exemplares de *E. sorbens* e das especies mais comuns de *Tabanus* e *Chrysops* que todos se tornam mais frequentes na primavera. E' verdade que Alfenas está situada mais para o Norte, na altura do Sul do Espirito Santo, mas tem tambem elevação consideravel, de modo que o aparecimento frequente da *D. longipennis* reprezenta sem duvida uma particularidade da especie, como fica provado tambem pela compozição das varias remessas. Em varios lugares, Agosto é considerado o mez da mutuca, no obstante só trazer poucas especies, ao passo que a maioria d'ellas só aparece de Novembro para Fevereiro. Até agora, julguei que esta noção se referia principalmente a *E. sorbens* que chama a atenção pelo seu tamanho, grossura, tromba muito comprida e zunido forte, mas agora julgo possivel que se refere tambem em parte a *D. longipennis*, que procurada nesta estação, será talvez encontrada, tambem, em outros lugares com alguma frequencia.

WALDO CRUZ, Direktor dieses Institutes, von Dr. GURGEL DO AMARAL eine kleine Sendung von Tabaniden, welche derselbe Ende Juli in ALFENAS im Süden des Staates MINAS gesammelt hatte. Dieselbe enthielt neben einigen Exemplaren der gemeinen und vereinzelt auch im Winter fliegenden *Erephopsis sorbens* WIED. nur *D. longipennis*; während des Julis kamen mehr Sendungen, bis mehr wie 30 Exemplare derselben Species vorlagen. Man kann daraus schliessen, dass die Art in dieser Zone nicht selten ist.

Besonders fällt aber die Flugzeit auf, die mit der Höhe des hiesigen Winters zusammenfällt, in welchem das Insektenleben sehr zurückgeht. Allerdings fliegt auch die *Diatomineura tabanipennis* MACQ. schon zu dieser Jahreszeit, doch ist dies hauptsächlich in den wärmeren Küstenstrichen der Fall, während *Neopangonia pusilla* LUTZ bei S. Paulo ganz zu Anfang des Winters auftritt. Sonst werden daselbst im Winter neben einer geringen Zahl der gemeinsten Tabanus- und Chrysops-Arten nur vereinzelne Exemplare von *E. sorbens* getroffen, die alle gegen den Frühling zu häufiger werden. Allerdings liegt ALFENAS bedeutender nördlicher, der Breite des Südens von Espirito Santo entsprechend, aber doch ebenfalls ziemlich hoch, sodass entschieden das häufige Vorkommen von *D. longipennis* als Eigentümlichkeit der Species angesehen werden muss, was ja auch die Zusammensetzung der Sendungen beweist. In manchen Gegenden gilt der August als Bremsenmonat, obgleich derselbe nur wenige Arten aufweist, während die grosse Mehrzahl derselben erst im November bis Februar auftritt. Bisher hatte ich die Klage über die Bremsen im August hauptsächlich auf *E. sorbens* bezogen, die durch Grösse, Dicke, langen Rüssel uns starkes Gesumme sich der Beobachtung aufdrängt; doch wäre es nach dieser Beobachtung nicht unmöglich, dass sie sich auch zum Teil auf *D. longipennis* beziehen, welche vielleicht bei Berücksichtigung der Flugzeit auch anderswo häufiger gefunden werden wird.

II.

Existencia de exemplares melanoticos de « Sarcophaga » e « Stomoxys ».

Ao passo que no genero *Sarcophaga* as moscas aprezentam o abdome tesselado, no genero vizinho *Phrissopoda* tem este a côr metalica ou preta uniforme. Por isso, podia-se considerar a existencia em certos exemplares de um abdome sem dezenho tesselado e completamente preto como carater de genero ou de especie, como tambem o fiz outrora com uma *Sarcophaga* que hoje não tenho á mão. Rezulta de observações posteriores que este modo de pensar não é necessariamente correto; pelo contrario, trata-se pelo menos em certos cazos, de variedades melanoticas.

Parece-me que tais variedades se encontram tambem no genero *Stomoxys* reprezentado entre nós apenas pela especie, cosmopolita e sem duvida introduzida, *Stomoxys calcitrans*. E' verdade que WIEDEMANN descreve mais duas especies do Brazil e outras da America do Sul; mas as suas observações sobre a existencia de outras especies lejitimas de *stomoxys* nestes territorios não acharam nova confirmação e eu não podia ter deixado de encontrar entre nós estas moscas, se atacavam homens e cavalos. De outro lado, obtive dous exemplares apanhados juntamente com a forma normal, dos quais um é muito escuro e outro tem o abdome de côr preta intensa, sem vestijio de manchas. Esta coloração não se explica satisfatoriamente pela absorção de sangue e não corresponde a especie descrita.

Tendo apanhado ha pouco uma grande *Sarcophaga* do sexo feminino, de torax escuro e abdome completamente preto, procurei uzal-a para criação. Esta se póde obter com facilidade pela expressão do abdome que na maioria das femeas contem larvas vivas. Dispoem-se sobre um

II.

Das Vorkommen melanotischer Exemplare von Sarcophaga und Stomoxys.

Während beim Genus *Sarcophaga* die Fliegen einen gewürfelten Hinterleib zeigen, soll bei dem nahestehenden Genus *Phrissopoda* der Hinterleib bald von einförmiger metallischer Farbe, bald schwarz gefärbt sein. Das Vorkommen von Stücken mit völlig schwarzem Hinterleibe, ohne Spur von Würfelung, liesse sich demgemäss als Genus- oder Speciescharacter auffassen, wie ich das früher bei einem Exemplare tat, welches mir jetzt leider nicht zur Hand ist. Im Lichte einiger seither gemachter Erfahrungen erscheint jedoch diese Auffassung nicht ohne Weiteres berechtigt; vielmehr handelt es sich wenigstens in einem Teile der Fälle um melanotische Varietäten.

Auch bei Stomoxys kommen, wie es scheint, solche Varietäten vor. Dieses Genus ist hier, soweit ich aus eigener Erfahrung schliessen darf, nur durch die zweifellos eingeführte, cosmopolitische *Stomoxys calcitrans* vertreten. Allerdings beschreibt WIEDEMANN noch zwei Arten aus Brasilien und andere aus Südamerika, aber es fehlt an neueren Bestätigung des Vorkommens anderer echter *Stomoxys*arten in diesen Gebieten; auch könnten mir solche hierzulande kaum entgangen sein, wenn sie Menschen oder Pferde angriffen. Nun besitze ich zwei zugleich mit der Normalform gefangene Exemplare, von denen das eine nur sehr dunkel ist, das andere dagegen einen intensiv und rein schwarzen, weder gewürfelten, noch glänzenden Hinterleib besitzt. Durch aufgenommenes Blut lässt sich die Färbung keineswegs befriedigend erklären; ebensowenig aber entspricht sie einer beschriebenen Art.

Als ich nun vor einiger Zeit ein sehr grosses *Sarcophaga*weibchen mit dunkelm Thorax und kohlschwarzem Hinterleibe fing, verwendete ich dasselbe zur Zucht. Dieselbe gelingt oft sehr leicht, weil man bei den meisten Weibchen durch Auspressen lebende Larvén erhält; man legt diese

pedaço de carne crua as larvas que o penetram ; depois de coberto com serragem, este é conservado num vazo de cultura. Nestas condições todas as larvas se dezenvolvem rapidamente e a metamorfoze se consuma depressa e com rezultado certo. Assim sucedeu tambem nesta experiencia seguindo-se a estadía larval de uma semana outra de ninfa com duração de cerca de 15 dias. Ao fim destes, obtive 8 moscas normais sendo 4 machos e 4 femeas ; mostravam o abdome normalmente tesselado, sem vestijio de melanismo, e foram determinadas como *Sarcophaga tesselata* Wied. Assim fica provado que a côr da mosca era anormal ; não podia ser explicada pelo alimente injerido, nem por algum processo morbido ou infeciozo e por isso deve ser considerada como melanismo. O mesmo se ha de ter dado nos cazos acima referidos de outros exemplares de *sarcophaga* e *stomoxys*.

III.

Especies de « Sarcophaga » de São Paulo.

Por varios anos colecionei em São Paulo especies de *Sarcophaga*, seja no ar aberto, uzando, ás vezes, para este fim carne crua e animais mortos, seja revistando diariamente janellas bem colocadas, onde entre muitas outras moscas, costumavam aparecer os dous sexos de muitas especies de *sarcophaga*. Obtive tambem material de Petropolis do Snr. J. G. Foetterle e do Rio de Janeiro onde colecionei ultimamente, achando, em geral, as mesmas especies. A determinação feita por mim e em parte por um dipterolojista conhecido não satisfez cabalmente. As razões que dificultam a determinação das especies numerozas e bastante parecidas entre si, comparando-as com as descrições existentes, já se acham expostas na *Fauna austriaca* de Schiner que procurou uzar para a chave das especies por elle descritas carateres anatomicos, como a dispozição das cerdas e espinhos en-

auf ein Stück rohes Fleisch, welches nach dem Eindringen der Larven mit Sägespänen bedeckt, in einem passenden Behälter gebracht wird. Unter diesen Bedingungen entwickeln sich die Larven gewöhnlich vollzählig und die Metamorphose geht rasch und sicher von statten. So war es auch diesmal. Auf ein Larvenstadium von einer Woche folgte eine Puppenruhe von ca. vierzehn Tagen. Am Ende derselben erhielt ich je vier vollständig normale Männchen und Weibchen, nach meiner Bestimmung zu *Sarcophaga tesselata* Wied. gehörig, welche alle einen normal gewürfelten Hinterleib und keine Spur von Melanismus zeigten. Es kann demgemäss nicht bezweifelt werden, dass die Färbung der Mutter eine abnorme war ; doch war dieselbe weder durch die aufgenommene Nahrung, noch durch einen Krankheits-, resp. infektiösen Process zu erklären und muss daher wohl als Melanismus angesprochen werden ; dasselbe hat dann wohl auch von den anderen angeführten Sarcophaga- und Stomoxysexemplaren zu gelten.

III.

Sarcophagaarten aus São Paulo.

Siet einer Reihe von Jahren habe ich in São Paulo *Sarcophaga*arten gesammelt, teilweise im Freien, besonders durch Auslegen von Köder, namentlich aber durch regelmässiges Untersuchen gut gelegener Fenster, wo sich unter zahlreichen anderen Fliegen auch *Sarcophaga*arten beider Geschlechter einzufinden pflegen. Durch Herrn J. G. Foetterle erhielt ich auch Material aus Petropolis und sammelte auch welches in Rio, wobei im ganzen dieselben Arten gefunden wurden. Die Bestimmung nahm ich teils selbst vor, teils liess ich sie durch einen bekannten Dipterologen vornehmen, war aber mit dem Resultate in beiden Fällen nicht sehr zufrieden. Die Gründe, warum es so schwierig ist, die zahlreichen und sich durchschnittlich sehr ähnlichen Arten nach den vorliegenden Beschreibungen zu bestimmen, finden sich schon in der *Fauna austriaca* von Schiner

contrados nas nervuras das azas. O mesmo sistema foi adotado por VAN DER WULP na *Biologia Centraliamericana*. Infelizmente, as especies numerozas das quais elle dá os carateres anatomicios procedem do Mexico, muitas vezes de lugares bastante elevados e parece que são quazi todas diferentes das nossas. Tambem a definição pelos carteres anatomicos nem sempre é facil; preciza-se de material bom e bastante abundante dos dous sexos, obtendo-se este mais facilmente pela criação, da qual me servi em alguns cazos. Assim, aprende-se a apreciar o significado da coloração e do dezenho, sempre necessarios para uma determinação rapida, e das suas variações, e a distinguir o tamanho normal dos exemplares frequentes de grandeza exajerada ou muito reduzida.

WIEDEMANN descreveu numerozas especies de *sarcophaga* procedentes do BRAZIL e em parte mesmo de SÃO PAULO não se conhecendo exatamente a proveniencia das outras. MACQUART acrecentou algumas especies, nem todas novas; tambem SCHINER publicou, do material da viajem do *Novara* algumas descrições, parecendo-me que se não descobriram outras especies depois delle. Rezulta da comparação com a minha coleção que existem especies indeterminadas, mas não convem descrevel-as antes de ter bem estudado as que já foram descritas.

Sobre a distribuição das varias especies, — circunstancia de utilidade para a determinação — ha pouca couza de conhecido; ao lado de especies muito espalhadas como a *S. chrysostoma* e a *S. georgina*, parece haver outras de *habitat* mais restrito. A introdução de fórmas novas afigura-se bastante facil em vista dos seus habitos e da sua evolução rapida. Algumas especies parecem aproximar-se das *Tachinae*

auseinandergesetzt, welcher daher auch beim Schlüssel der von ihm beschriebenen Arten anatomische Merkmale (Bedornung der Flügeladern, Chaetotaxis) anwendet. Ihm ist darin VAN DER WULP in der *Biologia Centraliamericana* gefolft. Leider stammen die sehr zahlreichen von ihm anatomisch genau charakterisierten Arten sämmtlich aus Mexico, meist aus bedeutenden Höhen und scheinen fast alle von den hiesigen verschieden. Uebrigens ist die Bestimmung nach anatomischen Merkmalen auch nicht immer ganz leicht und sie erfordert ebenfalls gutes (und womöglich reichliches) Material beider Geschlechter, was man am besten durch Zucht der betreffenden Arte erhält, wie ich sie allerdings nur bei einem Teile derselben ausgeführt habe. Dann lernt man den Wert der Farbenzeichnung, welche für eine rasche Bestimmung immer massgebend sein wird, und ihre Variationen besser verstehen und die Normalgrösse von den relativ häufigen Zwerg- und Riesenexemplaren unterscheiden.

Aus Brasilien hat WIEDEMANN zahlreiche Arten von Sarcophaga beschrieben, von denen welche sogar aus SÃO PAULO stammten, während bei den meisten anderen die genauere Herkunft unsicher ist. MACQUART hat noch einige Arten hinzugefügt, die aber nicht alle neu waren. Endlich hat auch SCHINER aus dem Materiale der Novarareise einige Arten veröffentlicht, zu denen meines Wissens seither keine hinzugekommen sind. Es gibt deren aber sicher noch mehrere, wie ich aus meiner eigenen Sammlung ersehen kann. Eine Beschreibung solcher scheint mir aber erst am Platze, wenn man sich über die früher beschriebenen einigermassen klar geworden ist.

Ueber die Verbreitung der einzelnen Arten, die bei der Bestimmung von grosser Wichtigkeit wäre, ist noch sehr wenig bekannt. Wahrscheinlich gibt es neben Arten von weitem Verbreitungsgebiete, wie *S. chrysostoma* und *georgina* andere mit mehr beschränkten Fundorten. Eine Verschleppung einzelner Arten dürfte bei ihrer Le-

no seu modo de viver, porque se observam ás vezes larvas maduras, saindo de insetos mortos e não se póde acreditar, com SCHINER, que estas foram sempre depozitadas depois da morte do inseto.

Depois de revista a minha coleção creio ter reconhecido com bastante certeza as especies seguintes de WIEDEMANN: *S. georgina*, *dimidiata*, *comta*, *phoenicurus* (=*rufipalpis* MACQ.), *obsoleta*, *calida*, *lambens*, *terminalis* e *modesta*. A sua *tesselata* combina bem com uma especie bastante frequente entre nós, sendo, porém, as dimensões d'esta bastante maiores; outra especie indijena póde ser referida á *S. plinthopyga*, descrita de WIEDEMANN da ilha de S. Thomaz. Outras duas correspondem ás *S. qudrivittata* MACQ. e *xanthophora* SCHINER. Além destas, tenho muitas sarcofagas pertencentes a, pelo menos, quatro especies aparentemente novas. Convem tambem notar que a coloração vermelha citada por WIEDEMANN como carateristica da *S. comta* só se encontra excecionalmente nos exemplares apanhados entre nós.

bensweise und raschen Entwicklung nicht auf allzugrosse Schwierigkeiten stossen. Einige Arten scheinen sich in ihrer Lebensweise den Tachinen zu nähern, indem man die Larven gelegentlich aus toten Insekten hervorkommen sieht, worauf sie sich sofort verpuppen; dabei ist kaum anzunehmen, dass sie, wie SCHINER will, in allen Fällen erst auf die toten Tiere abgelegt wurden.

Nach einer wiederholten Revisiom meiner Sammlung glaube ich folgende WIEDEMANN'sche Arten mit vollständiger Sicherheit erkannt zu haben:

S. chysostoma, *georgina*, *dimidiata*, *comta*, *S. phoenicurus* (=*rufipalpis* MAC.) *absoleta*, *calida*, *lambens*, *terminalis*, und *modesta*. *S. tesselata* WIED. stimmt mit einer hier häufigen, jedoch bedeutend grösseren Art; eine andere lässt sich auf *plinthopyga* WIED. (von der Insel ST. THOMAZ beschrieben) beziehen. Ferner scheinen je eine Art der *S. quadrivittata* MACQ. und eine andere der *S. xanthophora* SCHINER zu entsprechen. Ausserdem liegen noch eine Anzahl Stücke vor, welche wenigsten 3 Arten entsprechen und wahrscheinlich als neu angesehen werden müssen. Zu bemerken wäre noch, dass bei *S. comta* WIED die rote Färbung des Abdomens hierzulande als Ausnahme und nicht als Regel erscheint.

Estudos sobre flajelados

PELO

Prof. Dr. Max Hartmann

(Membro do Instituto de Molestias infetuozas em Berlin.)

E

Dr. Carlos Chagas

(Assistente)

(Estampas 4 a 9 e figuras no texto.)

Flagellaten-Studien

VON

Prof. Dr. Max Hartmann

UND

Dr. Carlos Chagas,

(Assistenten.)

(Hierzu Tafel 4 - 9 und Textfiguren.)

SUMARIO.

Introdução.

Material e metodos de pesquiza.

Parte Especial.

I. Protomonadina :
1. *Cercomonas parva* n. sp.
2. *Spongomonas uvella* (Stein) e *Sp. splendida* (Stein).
3. *Cyathomonas truncata.* (Fres.)

II. Binucleata :
Prowazekia cruzi n. g., n. sp.

III. Chromomonadina :
Chilomonas paramaecium (Ehrbg.).

IV. Euglenoidea :
Peranema trichophorum (Ehrbg.).

Parte Geral.

I. Nucleo e aparelho flajelar dos flajelados.
1. Centriolo.
2. Estrutura do nucleo e mitoze.
3. Aparelho flajelar.
4. Duplicidade nuclear.

II. Sistema dos flajelados.

Bibliografia.

Explicação das estampas.

INHALTSÜBERSICHT.

Einleitung.

Material und Untersuchungsmethoden.

Spezieller Teil.

I. Protomonadina :
1. *Cercomonas parva* n. sp.
2. *Spongomonas uvella* (Stein) und *Sp. splendida* (Stein).
3. *Cyathomonas truncata* (Fres).

II. Binucleata :
Prowazekia cruzi n. g., n. sp.

III. Chromomonadina :
Chilomonas paramaecium (Ehrbg.).

IV. Euglenoidea :
Peranema trichophorum (Ehrbg.).

Allgemeiner Teil.

I. Der Kern- und Geisselapparat der Flagellaten.
1. Centriol.
2. Kernbau und Mitose.
3. Geisselapparat.
4. Doppelkernigkeit.

II. Das System der Flagellaten.

Literaturverzeichnis.

Tafelerklärung.

INTRODUÇÃO.

Em alguns frascos de agua doce, provenientes de dois pantanos de Manguinhos, apareceram, em grande quantidade, algumas especies de flajelados. Como são muito lacunozos, especialmente nos flajelados de agua doce, os conhecimentos da estrutura do nucleo e do aparelho flajelar, assim como a divizão nuclear, rezolvemos estudar algumas fórmas delles, atentando nos pontos obscuros. Ao passo que das fórmas parazitarias, não só dos tripanozômos, como de seus afins, mas, tambem dos flajelados intestinais poliflajelados (*Trichomastix*, *Trichomonas*, *Hexamitus*, *Lamblia*, etc.) já existem alguns estudos citolojicos muito completos de v. PROWAZEK (1902), WENYON (1907), DOBELL, (1908), BENSEN (1909), quanto ás fórmas de agua doce, especialmente das Protomonadinas, só existe o primeiro trabalho sobre flajelados, de v. PROWAZEK (1902), no qual, pela primeira vez, tambem, este autor mostrou a grande significação que tem a estrutura fina do nucleo e do aparelho flajelar para a classificação dos flajelados, estabelecendo ainda alguns tipos principais desses flajelados para servir de padrões á futura classificação natural. Dest'arte, um dos intuitos deste trabalho foi acumular maior material para assim poder estabelecer, em definitiva, sobre tais bazes, a classificação. Os novos estudos sobre a estrutura do nucleo dos protozoarios e da relação que existe entre elle e o aparelho flajelar levaram HARTMANN e v. PROWAZEK (1907), em sequencia á concepção de SCHAUDINN, a estabelecer a homolojia do cariozoma e do blefaroplasto e centrozomio, assim como a aceitar a hipoteze da duplicidade nuclear das celulas dos protozoarios. O exame da veracidade desta hipoteze e a possibilidade de trazer para ella maior material elucidativo constitue o outro intuito de nossas pesquizas. Estas não formam tampouco a monografia completa dos referidos flajelados, tendo sido principalmente realizados nossos estudos com os dois objetivos acima referidos. As questões relativas á organização e biolojia

EINLEITUNG.

In einigen Gläsern mit Süsswasser, das aus zwei Tümpeln von Manguinhos stammte, traten in grosser Zahl einige Flagellatenarten auf. Da die Kenntnisse der Struktur des Kern- und Geisselapparates, sowie der Kernteilung gerade bei den primitiven Süsswasserflagellaten noch sehr lückenhaft sind, beschlossen wir einige dieser Formen nach dieser Richtung hin zu untersuchen. Während von parasitischen Formen, und zwar nicht nur den Trypanosomen und Verwandten, sondern auch den vielgeisseligen Darmflagellaten (*Trichomatix*, *Trichomonas*, *Hexamitus*, *Lamblia* etc.) durch die Arbeiten von v. PROWAZEK (1902), WENYON (1907), DOBELL (1908), BENSEN (1909), genauere cytologische Befunde vorliegen, existiert über die Süsswasserformen, speciell die Protomonadina, nur die erste Flagellaten-Arbeit von v. PROWAZEK (1902), in der dieser Autor auch zum ersten Male die grosse Bedeutung der feineren Struktur von Kern- und Geisselapparat für die Systematik der Flagellaten betont und einzelne Haupttypen derselben als Grundlage eines künftigen natürlichen Systems aufgestellt hat. In dieser Richtung weiteres Material beizubringen und so eventuell ein System auf dieser Grundlage endgültig durchführen zu können, war das eine Ziel unserer Untersuchung.

Die neueren Studien über den Aufbau der Protozoenkerne und ihr Verhältnis zur Geisselbildung haben HARTMANN und v. PROWAZEK (1907) in Weiterführung SCHAUDINN'scher Anschauungen zu einer Homologie von Caryosom, Blepharoplast und Centrosom, sowie der Annahme einer Doppelkernigkeit der Protozoen-Zelle geführt. Die Richtigkeit dieser Hypothese zu prüfen und eventuell weiteres Beweis-Material für sie beizubringen, war der zweite Gesichtspunkt unserer Untersuchungen. Dieselben bezwecken also nicht ein vollständiges monographisches Studium der betreffenden Flagellaten, sondern waren in erster Linie auf diese beiden Fragen gerichtet. Ueber andere Verhältnisse in der

dos citados flajelados serão apenas mencionadas acidentalmente, quando oportuno, sem que tenham constituido objeto especial de nossas investigações.

MATERIAL E METODOS DE PESQUIZA.

Como já foi dito, provinha o material de dois charcos de agua doce nos quais, ao lado de amebas, arcelas, etc. apareciam, em grande cópia, principalmente algumas especies de flajelados. Apoz algum tempo a maioria das formas dezaparecia de nossos depozitos de laboratorio, mas, com facilidade, outra colheita nos pontos de orijem fornecia-nos, novamente, material de estudo. Encontravam-se, sobretudo, as seguintes especies: *Cyathomonas truncata* Fres., *Spongomonas uvella*, *Rhipidodendron splendidum*, *Peranema trichophorum* e *Chilomonas paramaecium*. Variava muito com o tempo a relação numerica das especies entre si: ás vezes só se encontrava *Cyathomonas*, outras preponderava o *Spongomonas*; o *Chilomonas* era o mais abundante e o que mais tempo rezistia. O *Peranema* raramente aparecia em grande abundancia. Além desses, eram reprezentadas uma especie pequena de *Monas*, uma *Oicomonas* e uma *Dimastigamoeba*.

Dois outros flajelados apareceram em culturas de agar que o Dr. Gomes de Faria tinha feito, de fezes humanas, culturas essas que, amavelmente, nos cedeu. Seja-lhe aqui consignado o penhor de nossos agradecimentos. Na placa de cultura orijinal existia proliferação abundantissima de uma só fórma de flajelado que se aproxima do *Bodo* pela dispozição do flajelo, mas, que delle se afasta, claramente, pelo seu modo de inserção e pelo aspeto do nucleo. Parece-nos ser identica a uma especie de *Bodo* figurada por v. Prowazek (1902) e para ella criamos novo genero e especie *Prowazekia cruzi*. Facilmente foram obtidas transplantes dessa cultura, mas, algumas semanas apoz, foram ellas impurificadas por segundo flajelado, uma especie de *Cercomonas*, para a qual criámos nova especie. A confecção dos preparados era muito simples. Para as fórmas de agua doce, colocaOrganisation und Biologie der betreffenden Flagellaten werden wir mithin nur soweit berichten, als sie nebenbei ohne besondere Untersuchungen erhoben werden konnten.

MATERIAL UND UNTERSUCHUNGSMETHODEN.

Wie erwähnt stammte das Material aus Wasser zweier Süsswassertümpel, in denen neben Amoeben, Arcellen etc. besonders einige Flagellatenarten in grosser Anzahl auftraten. Nach einiger Zeit verschwanden zwar die meisten Formen in unseren Glasgefässen, doch konnten wir sie durch frische Füllung wieder erhalten. Es handelt sich hauptsächlich um folgende Arten: *Cyathomonas truncata* Fres., *Spongomonas uvella*, *Rhipidodendron splendidum*, *Peranema trichophorum* und *Chilomonas paramaecium*. Das Mengeverhältnis der einzelnen Arten war zeitlich ausserordentlich verschieden; manchmal fand sich fast nur *Cyathomonas*, ein andermal überwog *Spongomonas*, am häufigsten war meist *Chilomonas*, die auch stets am längsten ausdauerte, *Peranema* trat am seltensten in grösserer Anzahl auf. Ferner war öfters eine kleine *Monasart*, eine *Oicomonas* und eine *Dimastigamoeba* reichlich vertreten.

Zwei weitere Flagellaten traten in Agarkulturen auf, die Herr Dr. Gomes de Faria aus menschlichen Fäces angelegt hatte, und die uns derselbe freundlich überliess. Auch an dieser Stelle sei ihm dafür unser Dank ausgesprochen. Zunächst fand sich auf der Originalplatte nur eine ausserordentlich reiche Kultur einer Form, die ihren Geisselverhältnissen nach zu *Bodo* gehört, sich nach Geisselinsertion und Kern aber von ihr wesentlich unterschied. Sie scheint uns mit der von v. Prowazek (1902) abgebildeten *Bodo spec.* identisch zu sein und wir haben für sie eine neue Gattung u. Species: *Prowazekia cruzi* errichtet. Es gelang leicht diese Kulturen weiter zu führen, doch trat nach einigen Wochen wohl durch Verunreinigung ein zweites Flagellat auf, eine *Cercomonas*-Art, für die wir eine neue Species errichtet haben.

vamos laminulas sobre a superficie da agua e as deixavamos por algum tempo, geralmente de uma a muitas horas, muitas vezes durante uma noite inteira. A' face inferior das mesmas colava-se, nesse tempo, grande numero dos protozoarios existentes na agua, podendo-se, então, levantar cuidadozamente a laminula e fixal-a a humido, a modo de um esfregaço (*frottis*) sem perda sensivel de material.

Como fixadores utilizavamos o sublimado-alcool de SCHAUDINN ou o liquido de HERMANN; as colorações se faziam com a hematoxilina férrea, segundo HEIDENHAIN ou ROSENBUSCH. São estes metodos de preparação perfeitamente utilizaveis para os protozoarios d'agua doce, obtendo-se com elles, em curto prazo, excelentes preparados. Além disso, tais preparados, como tivemos ocazião de verificar, por comparação, têm sobre os processos dos córtes, grande vantajem, porque permitem ver em conjunto todo o animal cuja organização póde ser, então, facilmente compreendida, sem que as figuras na interpretação e analize sejam inferiores á dos córtes.

PARTE ESPECIAL.

I. PROTOMONADINA:

1. Cercomonas parva n. sp.

O organismo que vamos aqui descrever apareceu, como dissemos, na cultura da *Prowazekia*. Trata-se, evidentemente, de nóva especie que denominamos *parva* e que se enquadra no genero *Cercomonas* de DUJARDIN, no sentido que a elle damos (v. mais adiante).

ASPETO. — O flajelado tem fórma de pera ou antes de fuzo e, apezar de sua forte variabilidade ameboide, é claramente monaxonico. A extremidade anterior é reconhecivel pela prezença de grande e longo flajelo e a porção posterior pelo denominado prolongamento caudal.

O flajelado livre, nadando, tem, junto á extremidade anterior, a porção mais larga, na qual se depara o nucleo (Est. 4. Fig. 1 e 4). Seu comprimento, incluido o

Die Herstellung der Präparate war sehr einfach. Bei den Süsswasserformen legten wir Deckgläser auf die Wasseroberfläche und liessen sie darauf eine zeitlang liegen, meist eine bis mehrere Stunden, vielfach auch über Nacht. An der Unterseite derselben heften sich während dieser Zeit die im Wasser lebenden Protisten meist in grosser Anzahl fest und man kann dieselben dann vorsichtig abheben und wie Deckglasaustriche feucht fixieren, wobei kaum Material verloren geht. Zum Fixieren benutzten wir SCHAUDINN'schen Sublimatalkohol und HERMANN'sche Flüssigkeit; gefärbt wurde vorwiegend mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN oder ROSENBUSCH. Wir können diese Präparationsmethode für Süsswasserprotozoen ausserordentlich empfehlen, da man damit in kürzester Zeit vorzügliche Präparate erhält. Dieselben haben zudem, wie wir uns durch Vergleiche überzeugen konnten, vor Schnittpräparaten noch den grossen Vorteil, dass man stets das ganze Tier vor sich hat und so die Organisation leichter verstehen kann, ohne dass die Bilder an Deutlichkeit und Auflösung den Schnitten nachstehen.

SPEZIELLER TEIL.

I. PROTOMONADINA:

1. Cercomonas parva n. sp.

Der hier zu beschreibene Organismus trat wie erwähnt nach einiger Zeit in der Kultur von *Prowazekia* auf. Es handelt sich offenbar um eine neue Art, die wir *parva* nennen und in die DUJARDIN'sche Gattung *Cercomonas*, jedoch in den von uns gefassten Sinne (siehe später), einreihen.

GESTALT.—Das Flagellat besitzt eine birnförmige resp. mehr spindelförmige Gestalt und ist trotz seiner starken amoeboiden Veränderlichkeit ausgesprochen monaxon; das Vorderende ist durch die beträchtlich lange Geissel, das hintere durch den sog. Schwanzfortsatz gekennzeichnet. In der Nähe des Vorderendes ist das Flagellat im ungestörten, schwimmenden Zustande am breitesten und hier liegt der Kern (Taf 4, Fig. 1 und 4). Seine Länge beträgt

prolongamento caudal, excluindo-se, porem, o flajelo, é de 6,5—20 μ, dos quais, nas fórmas grandes, cerca de 5 μ pertencem ao prolongamento caudal. A largura é de 3 a 5 μ. Ambos os pólos são afilados e são reconheciveis, mesmo durante os movimentos ameboides. Assim se distingue o genero, dum lado da mastigameba poliaxonica e doutro lado do genero *Oicomonas*, de fórma mais ovalar e não terminado em apendice caudal afilado, ponto este, de que voltaremos a tratar mais tarde.

Filamento axial. — A fórma caracteristica da celula, que é inteiramente ameboide, e, portanto, em estado liquido, depende de esqueleto, constituido por uma fibrila axial que teve orijem no nucleo, situado na extremidade anterior, e se estende até a extremidade do prolongamento caudal. Este filamento axial é relativamente mais vizivel no estado vivo ; e nesse exame tem-se a impressão de que elle vem diretamente do flajelo (Est. 4, Fig. 2). Isto provem de que, durante a vida, em regra, o nucleo não é vizivel e que do respetivo cariozoma parte, dum dos lados (do de traz), o filamento axial, e do outro (do da frente) o flajelo ou seu rizoplasto (Est. 4, Fig. 1 e 4). Mas, quando é possivel, o que raro acontece, observar-se o nucleo durante o estado vivo (Est. 4, Fig. 1), vê-se, então, que elle se acha encaixado na continuidade das fibrilas (filamento axial e flajelo) aparentemente unicas. O filamento axial é dificilmente vizivel nos preparados córados ; os melhores são obtidos com a hematoxilina férrea de Rosenbusch. Tais preparados trouxeram a convicção de que elle se orijina do cariozoma do nucleo. Como já foi dito, o filamento axial é um elemento morfojenico no sentido de Koltzoff (1906), Hartmann e v. Prowazek (1907). A elasticidade dessa fibrila, presuposta por tal concepção, é, em nosso cazo, patente por ocazião dos movimentos ameboides da celula. O movimento ameboide não é completo, só póde ter a extensão que lhe permite o filamento axial, elastico e rijo, implantado no meio do protoplasma liquido, e que pelo movimento se

inklusive Schwanzfortsatz, aber ohne Geissel 6,5—20 μ, wobei bei den grösseren Formen etwa 5 μ dem Schwanzfortsatz zufallen. Die Breite ist c. 3—5 μ. Beide Pole sind zugespitzt und bleiben auch bei der amoeboiden Bewegung erkenntlich. Dadurch unterscheidet sich die Gattung einerseits von der polyaxonen Gattung *Mastigamoeba*, andererseits von der stets mehr ovalen, nicht in einem Schwanzfortsatz ausgezogene Gattung *Oicomonas*, worauf wir zum Schlusse noch zurückkommen.

Axenstab. — Die charakteristische Gestalt der sonst volkommen amoeboiden, also in flüssigem Zustand befindlichen Zelle wird durch ein eigenes Skelett-Element bedingt, nämlich eine feine axiale Fibrille, die von dem im Vorderende gelegenen Kern ausgeht und sich bis in die Spitze des Schwanzfortsatzes erstreckt. Im Leben ist dieser Axenstab verhältnismässig am leichtesten zu beobachten ; hierbei gewinnt man den Eindruck, als ob er sich direkt in die Geissel fortsetzte (Taf. 4, Fig. 2). Das kommt daher, dass im Leben der Kern in der Regel nicht wahrzunehmen ist, von dessen Caryosom einerseits (nach hinten) der Axenstab, andererseits (nach vorn) die Geissel resp. deren Rhizoplast ausgeht (Taf. 4, Fig. 1 und 4). Wenn aber einmal, was äusserst selten, auch im Leben der Kern zu beobachten ist (Taf. 4, Fig. 1) ; dann sieht man, dass er in den Verlauf der scheinbar einheitlichen Fibrille (Axenstab und Geissel) eingeschaltet ist. Im gefärbten Präparat ist der Axenstab schwer nachzuweisen, am ersten gelingt es mit Eisenhämatoxylin in der Modifikation von Rosenbusch. An solchen Präparaten konnte man sich deutlich überzeugen, dass er vom Caryosom des Kernes ausgeht.

Wie schon erwähnt, ist der Axenstab ein formgebendes Element in dem Sinne von Koltzoff (1906), Hartmann u. v. Prowazek (1907). Die bei dieser Auffassung vorausgesetzte Elastizität der Fibrille tritt in unserem Falle deutlich bei der amoeboiden Veränderung der Zelle zu Tage. Die amoeboide Beweglichkeit ist nämlich keine vollkom-

recurva perdendo a pozição retilinea (Est. 4, Fig. 2). As mensurações feitas em varios dezenhos exatos de diversos aspetos morfolojicos da mesma celula, mostram que o filamento axial recurvado durante os movimentos ameboides (Est. 4, Fig. 2), tem sempre o mesmo comprimento que quando não encurvado i. é, elle reprezenta um todo rijo e elastico que se curva em virtude das modificações ativas do plasma (consecutivas ás variações de tensão superficial) e não uma estrutura contratil, como até a pouco tempo era e, em parte ainda é (Ballowitz), a idéa dominante sobre todas as estruturas fibrilares analogas. Esta observação demonstra, com a mesma exatidão que as verificações experimentais de v. Prowazek (1908), nas celulas-tripanozômos e de Koltzoff, nas espermias a natureza elastica desse elemento fibrilar. No ponto de vista genezico o filamento axial é a centrodesmoze (fuzo central conservado) proveniente da ultima divizão nuclear, como é bem o cazo, segundo v. Prowazek (1904) na *Trichomastix lacertae*. Sobre tal assunto ainda voltaremos.

Flajelo. — O flajelo tem o comprimento do corpo, cerca de 15 μ e, nas mais das vezes, alonga-se em linha reta para frente. Sae da parte anterior do corpo, de corpusculo bazal simples, que, por sua vez se acha ligado ao cariozoma do nucleo por intermedio duma fibrila — o rizoplasto (Est. 4, Fig. 1, 3 e 4). E' este um modo de inserção nuclear que já se póde considerar tipico para parte das protomonadinas, apoz os estudos de v. Prowazek (1902). Genezicamente tal estrutura é explicavel, compreendendo-se o corpusculo bazal e o rizoplasto como centriolo e centrodesmoze da primeira divizão heteropolar do cariozoma ; o flajelo propriamente dito seria centrodesmoze da divizão do corpusculo bazal (2.ª divizão heteropolar), como pela primeira vez indicou Schaudinn (1904) nos tripanozômos, no que foi mais tarde secundado por v. Prowazek (1905), Hartmann (1907), Rosenbusch (1908) e Chagas (1909). Em nosso cazo, não pudemos demonstrar o fato genezicamente para

mene, sondern kann sich nur soweit äussern, als es der in das flüssige Protoplasma eingefügte feste, elastische Axenstab zulässt, der dabei aus seiner gestreckter Lage verbogen wird (Taf. 4, Fig. 2). Messungen, die nach genauen Zeichnungen von verschiedenen Formzuständen derselben Zelle gemacht wurden, zeigen nun, dass der Axenstab im verbogenen Zustande, also bei der amoeboiden Bewegung (Taf. 4, Fig. 2), dieselbe Länge aufweist, wie im gestreckten, d. h. er ist ein starres, elastisches Gebilde, das durch die aktive Veränderung des Plasmas (durch Aenderung der Oberflächespannung) verbogen wird, nicht ein kontraktiles Gebilde, wie bis vor kurzem für derartige fibrilläre Strukturen die allgemein herrschende Ansicht war und zum Teil noch ist. (Ballowitz). Diese Beobachtung beweist jedoch mit derselben Sicherheit, wie die experimentellen Befunde von Prowazek (1908) an der Trypanosomenzelle und die von Kaltzoff an Spermien, die elastische Natur dieser fibrillären Elemente.

Genetisch ist der Axenstab die von der vorausgegangenen Kernteilung erhalten gebliebene Centrodesmose (Centralspindel), wie dies nach v. Prowazek (1904) auch bei *Trichomastix lacertae* der Fall ist. Wir werden hierauf noch zurückkommen.

Geissel. — Die Geissel ist etwa körperlang (c. 15 μ) und meist gerade nach vorn gestreckt. Im Vorderende des Zellleibes entspringt sie von einem einfachen Basalkorn, das seinerseits wieder durch eine Fibrille, den Rhizoplasten, mit dem Caryosom des Kernes verbunden ist (Taf. 4, Fig. 1, 3, 4). Es ist das ein Verhalten der Geisselinsertion, wie es schon nach den Untersuchungen von v. Prowazek (1902) für einen Teil der Protomonadinen als typisch gelten konnte. Diese Struktur erklärt sich genetisch in der Weise, dass das Basalkorn und der Rhizoplast als Centriol und Centrodesmose einer ersten heteropolen Teilung des Caryosoms aufzufassen sind, die eigentliche Geissel aber als die Centrodesmose einer Teilung des Basalkornes (zweite heteropole Teilung), wie das in ähnlicher

o flajelo, mas a fig. 13 da Est. 4 mostra a justeza dessa interpretação na formação do rizoplasto e do corpusculo bazal. No que respeita á estrutura fina do flajelo não foram feitas pesquizas especiais, mas, a maneira ulterior de se comportar na divizão celular mostra ser elle constituido de mais de uma fibrila (duas).

Movimento. — Já falámos acima do movimento ameboide e de sua dependencia do filamento axial.

Tambem a especie de movimento natatorio deve estar relacionada com os elementos morfojenicos. Neste movimento o corpo conserva seu aspeto piriforme e, contrariamente ao que se dá na *Prowazekia*, com elle concomitante, aprezenta movimento, sem grandes convulsões, pendulando levemente para frente, sendo o flajelo dirijido para diante em linha quazi réta, mostrando geralmente na extremidade um movimento em sacarolhas.

Esta maneira de ser leva a concluir pela relativa solidez do esqueleto flajelar. A mudança de direção faz-se da maneira seguinte: na rejião em que se insere o flajelo, nota-se um brusco encurvamento ou movimento convulsivo limitado ao flajelo, ou a este e mais ao segmento anterior da celula, de modo que as fibrilas morfojenicas ficam encurvadas por um pequeno espaço de tempo e tomam outra direção depois de voltar á fórma reta primitiva.

Plasma. — Pouco ha que dizer sobre o plasma regularmente alveolado e desprovido de periplasto. E' tambem nú, o que explica a grande variabilidade ameboide da celula. Não existe abertura bucal, a absorção dos alimentos se dá á maneira das amebas, por todos os pontos da superficie celular. Não foi observado vacuolo contratil.

Nucleo. — Só raramente o nucleo é vizivel no estado vivo, em que se aprezenta como vezicula esferica, na qual se diviza grande cariozoma. Tal aspeto concorda com o que se vê nos preparados córados; é um nucleo cariozomico simples em cujo cario-

Weise zuerst Schaudinn (1904) bei Trypanosomen angegeben hat, wo es später von v. Prowazek (1905), Hartmann (1907), Rosenbusch (1908) und Chagas (1909) bestätigt wurde. In unserem Falle können wir zwar für die eigentliche Geissel nicht den genetischen Beweis erbringen, dagegen zeigt Fig. 13, Taf. 4 die Berechtigung dieser Auffassung für die Entstehung von Rhizoplast u. Basalkörper. Ueber den feineren Bau der Geissel wurden keine besondere Untersuchungen angestellt, doch beweist sein späteres Verhalten bei der Zellteilung, dass sie aus mehreren (2) Fibrillen zusammen gezetzt ist.

Bewegung. — Wir sprachen oben schon von der amoeboiden Beweglichkeit und ihrer Abhängigkeit von dem Axenstab. Auch die Art der Schwimmbewegung dürfte durch die formgebenden Elemente wesentlich bestimmt sein; hierbei behält der Körper seine birnförmige Gestalt und bewegt sich im Gegensatz zu der mit ihr vorkommenden *Prowazekia* ohne heftige Zuckungen, nur leicht pendelnd nach vorwärts, wobei die Geissel ziemlich gestreckt nach vorn gerichtet ist und meist an der Spitze schraubenförmige Bewegung zeigt. Dies Verhalten lässt auf eine ziemliche Festigkeit des Geisselskelettes schliessen. Richtungsänderungen treten in der Weise ein, dass plötzlich in der Gegend der Geisselinsertion entweder nur die Geissel oder mit ihr das Vorderende der Zelle eine Biegung oder Knickung erfährt, wodurch die formgebenden Fibrillen für kurze Zeit verbogen werden und nach Herstellung der Streckung eine andere Richtung einnehmen.

Plasma. — Ueber das Plasma ist wenig zu sagen, es ist gleichmässig wabig gebaut und weist keinen Periplasten auf. Es ist also nackt, was die grosse amoeboide Veränderlichkeit der Zelle erklärt. Eine besondere Mundstelle ist nicht vorhanden; die Nahrungsaufnahme geschieht offenbar nach Art der Amoeben an jeder Stelle der Zelloberfläche. Eine kontraktile Vakuole wurde nicht beobachtet.

Kern. — Der Kern ist im Leben nur äusserst selten zu sehen und erweist sich

zoma se acha contida toda substancia cromatica (cromatina e plastina). A zona de suco nuclear, que cerca o cariozoma, é separada do plasma por delgada membrana, e, nas mais das vezes não aprezenta estrutura; apenas, eventualmente, póde-se ver nelle septos de linina com alguns granulos de cromatina. (Est. 4, Fig. 5 e 12). Isto mostra que o cariozoma é séde de trócas nutritivas ciclicas, como se verifica facil e claramente em outras fórmas. Nos nucleos em repouzo, consequentemente á estrutura compacta do cariozoma, não se póde ver o centriolo, se bem que seja indubitavel a existencia delle, como se verifica na divizão nuclear.

Multiplicação. — A multiplicação se dá por divizão binaria simples; os carateristicos de divizão lonjitudinal não se patenteam claramente, por isso que, mercê da fuzão do filamento axial que precede a divizão do flajelado, dezaparece por completo seu carater monoaxonico (Est. 4, Fig. 5 a 11), tornando-se a fórma ovalar (Est. 4, Fig. 6, 8 e 9) ou completamente esferica (Est. 4, Fig. 7 e 10). Seja acentuado que o eixo da divizão nuclear está na maioria das vezes no eixo lonjitudinal do flajelado, emquanto esse é reconhecivel. Ulteriormente, parece sofrer uma torção de 90° de maneira que, como acontece nos flajelados, o plano de divizão coincide com o eixo lonjitudinal do animal (divizão lonjitudinal). A's vezes, a figura da divizão nuclear desde o começo se acha colocada transversalmente sobre o eixo lonjitudinal (Est. 4, Fig. 5 e 7). A divizão nuclear se processa só no cariozoma como era de esperar, tratando-se d'um simples nucleo cariozomico. Infelizmente, no que respeita á estrutura fina nossa fórma é desfavoravel objeto de estudo, em consequencia da natureza compacta do cariozoma e da rapidez com que se processa a divizão. Aparentemente, manifesta-se como simples estrangulamento do cariozoma (a chamada *amitoze*). Não obstante, se póde verificar que, logo no inicio se dá a divizão do centriolo, até então invizivel; em consequencia disso aparecem os 2 centriolos filhos unidos pela centrodesals ein kugeliges Bläschen, in dem man nur ein grosses Caryosom wahrnimmt. Damit stimmt seine Struktur in gefärbten Präparaten; er ist ein einfacher Caryosomkern, in dessen Caryosom alle färbbare Substanz enthalten ist (Chromatin und Plastin). Die das Caryosom umgebende Kernsaftzone ist gegen das Plasma durch eine feine Membran abgegrenzt, und meist völlig strukturlos; nur gelegentlich kann man darin Lininwände und einzelne Chromatinkörnchen beobachten (Taf. 4, Fig. 5 und 12). Es deutet das auf zyklische Umsätze am Caryosom hin, wie sie bei anderen Formen deutlich zu beobachten sind. Am ruhenden Kerne konnte wegen der Kompaktheit des Caryosoms kein Centriol nachgewiesen werden; doch ist dessen Vorhandensein, wie die Kernteilung zeigt, wohl ausser Zweifel.

Fortpflanzung. — Die Vermehrung geschieht durch einfache Zweiteilung; ihr Charakter als Längsteilung tritt hierbei nicht deutlich zu Tage, da durch Einschmelzung des Axenstabes vor der Teilung das Flagellat seine monaxone Gestalt völlig einbüsst (Taf. 4, Fig. 5 bis 11) und oval (Fig. 6, 8, 9) oder ganz kugelig wird (Taf. 4, Fig. 7 u. 10). Hervorzuheben ist, dass die Kernteilungsaxe meist in der Längsaxe des Flagellaten liegt, soweit letztere noch erkannt werden kann. Doch scheint es nachträglich noch zu einer Drehung um 90° zu kommen, so dass, wie sonst bei Flagellaten, die Teilungsebene mit der Längsaxe des Tieres zusammen fällt (Längsteilung). Manchmal wird auch die Kernteilungsfigur von Anfang an quer zur Längsaxe angelegt (Taf. 4, Fig. 5 und 7).

Die Kernteilung spielt sich, wie bei einem einfachen Caryosomkern nicht anders zu erwarten, ganz am Caryosom ab. Leider ist für das feinere Studium derselben unsere Form in Folge der Kompaktheit des Caryosoms und des raschen Verlaufes der Teilung ein sehr ungünstiges Objekt. Sie erscheint scheinbar als eine einfache Durchschnürung des Caryosoms (sog. Amitose). Doch konnte beobachtet werden, dass zu Beginn erst das bisher nicht sichtbare

moze (*fuzo central*) de cada lado oposto do centrozomio, ainda esferico, podendo ser elles assim percebidos (Est. 4, Fig. 5). Por ocazião da divizão da totalidade do cariozoma tornam-se de novo inviziveis (Est. 4, Fig. 6 e 8) e nos ultimos estádios sómente a centrodesmoze (*Centralspindel*) é vizivel (Est 4, Fig. 10). A's vezes toda a divizão do cariozoma se dá completamente no interior da membrana nuclear (Est. 4, Fig. 9), se bem que seja isso raridade. Em regra, a totalidade do nucleo se alonga já, por ocazião do aparecimento da fórma em halteres do fuzo cariozomico (Est. 4, Fig. 7 e 8) e, assim, se dividem simultaneamente. Os dois nucleos filhos se acham ainda ligados por meio de centrodesmoze, que, porem, assim como o filamento axial é dificilmente caraterizavel pelas colorações (Est 4, Fig. 10). Póde-se, com certeza, aceitar a idéa da permanencia definitiva destes e que, por ocazião da separação por estrangulamento da celula, delle provenham os filamentos axiais das celulas filhas, pelo mesmo modo que foi verificado por v. Prowazek (1904) para o *Trichomastix lacertae*. Dallinger e Drysdale (1873) figuraram para a *Cercomonas typica* uma chamada divizão transversal que já mostrava alongamento em fórma de fino prolongamento caudal, não tendo elles podido, naturalmente, observar o filamento axial, com os recursos da tecnica de que outr'ora se dispunha.

A descrição de v. Prowazek foi ultimamente criticada por Dobell (1909) que interpretou os fatos diversamente, considerando, de acordo com suas observações sobre especies analogas, que o filamento axial deveria provir genezicamente das centrodesmozes pertencentes aos corpusculos bazais (blefaroplasto, segundo Dobbel). Como, em nosso cazo, dezaparecem cedo o flajelo e o corpusculo bazal do animal em divizão (Est. 4, Fig. 5, 10 e 11), fica completamente rejeitado o modo de ver de Dobell.

E' digno de nota, ainda. que, por duas vezes, ao lado do cariozoma em divizão

Centriol sich teilt; dabei treten die durch die Centrodesmose (Centralspindel) verbundenen Tochtercentriolen über das noch kugelige Caryosom an entgegengesetzten Seiten hervor, wodurch sie eben wahrgenommen werden können (Taf. 4, Fig. 5). Bei der Teilung des ganzen Caryosoms werden sie dann wieder unsichtbar (Taf. 4, Fig. 6, 8) und in den letzten Stadien tritt nur wieder die Centrodesmose (Centralspindel) zu Tage (Taf. 4, Fig. 10). Manchmal wird die ganze Caryosomteilung noch innerhalb der Kernmembran vollständig durchgeführt (Taf. 4, Fig. 9), doch ist es eine Seltenheit. In der Regel streckt sich der ganze Kern schon in dem Hantelstadium der Caryosomspindel (Taf 4, Fig. 7, 8) und teilt sich gleichzeitig mit durch. Die beiden Tochterkerne sind noch durch die Centrodesmose verbunden, die aber ebenso, wie der Axenstab, färberisch schwer darstellbar ist (Taf. 4, Fig. 10). Man kann wohl mit Sicherheit annehmen, dass sie dauernd erhalten bleibt und aus ihr bei der Durchtrennung der ganzen Zelle die Axenstäbe der Tochterzellen entstehen, in derselben Weise wie das v. Prowazek (1904) für *Trichomastix lacertae* angegeben hatte. Dallinger u. Drysdale (1873) haben von *Cercomonas typica* eine sog. Querteilung abgebildet, die das Ausziehen zu einem feinen Schwanzfortsatz schön illustriert, während sie den Axenstab natürlich mit den damaligen Hilfsmitteln nicht beobachten konnten. Die Darstellung von v. Prowazek wird zwar neuerdings von Dobell (1909) beanstandet und anders gedeutet, indem sich nach seinen Beobachtungen an ähnlichen Arten der Axenstab genetisch von der Centrodesmose der Basalkörper (Blepharoplast nach Dobell) herleiten soll. Da bei unserem Objekt die Geissel und der Basalkörper des Eltertiers bei der Teilung meist frühzeitig ganz verloren geht (Taf. 4, Fig. 5, 10, 11), so ist hierfür die Dobbel'sche Darstellung völlig ausgeschlossen.

Zu erwähnen wäre noch, dass zweimal neben dem sich teilenden (Taf. 4, Fig. 6) respektive geteilten (Taf. 4, Fig. 9) Caryosom, zwei stark gefärbte Körner in der

(Est. 4, Fig. 6) ou já dividido (Est. 4, Fig. 9) foram observadas no interior do nucleo duas granulações fortemente córadas, que parecem provenientes da divizão de um só granulo, anteriormente separado do cariozoma, o que era demonstrado pela pozição em que estavam. Do que aqui se tratava, não poude ser determinado.

O modo de se comportar do flajelo, tambem, não poude ser acompanhado em todas as fazes. Certo é que, na maioria das vezes, elle se perde muito cedo (Est. 4, Fig. 5) e que, em todo cazo, nos estádios mais serodios nunca se vê flajelo (Est. 4, Fig. 10 e 11). Assim, logo apoz cada divizão nuclear ou celular elle deve ser de novo formado pelo cariozoma, como, segundo nossas observações acontece tambem na maioria das vezes com as protomonadinas e rizomastijinas. A nova formação se processa pela mesma maneira que apoz a saída dos cistos. Formam-se aqui o corpusculo bazal e o rizoplasto, como mostra a Fig. 13 da Est. 4, por meio de mitoze heteropolar do cariozoma ; a formação do flajelo propriamente dito assim, podia orijinar-se tambem de segundo fuzo heteropolar.

No estádio inicial da divizão, vêm-se bastas vezes duplo flajelo (Est. 4, Fig. 6 e 8) e um flajelo bifurcado na extremidade (Est. 4, Fig. 7). Como, seguramente, tal figura nada tem que ver com a neojeneze ou divizão do flajelo, acreditamos, que tem alguma relação com a dissolução do mesmo, mostrando ser constituido por multiplas fibrilas, o que já é conhecido nos flajelos dos flajelados, assim como nas fibrilas da cauda dos espermatozoides (Ballowitz).

Cistos. — Ao cabo de algum tempo o flajelado se encista nas placas de agar. O cisto é um simples cisto de rezistencia ; fenomenos que fizessem supor a existencia de fecundação autogamica não foram observados. Elle é limitado por dupla membrana e, no plasma, vêm-se granulações que parecem constituidas de substancias de rezerva.

Kernhöhle beobachtet wurden, die durch Teilung eines einzigen wohl zuvor vom Caryosom abgetrennten Kornes entstanden zu sein scheinen, worauf ihre Lagerung hinweist. Um was es sich hier handelt, konnte nicht festgestellt werden.

Auch das Verhalten der Geissel konnte nicht in allen Teilen verfolgt werden. Sicher ist, dass sie meist sehr früh verloren geht (Taf. 4, Fig. 5) und dass jedenfalls in den späteren Stadien niemals eine Geissel zu sehen ist (Taf. 4, Fig. 10 u. 11). Sie muss daher offenbar nach der Kern- resp. Zellteilung jedesmal neu vom Caryosom ausgebildet werden, wie dies nach unseren Beobachtungen auch sonst bei Protomonadinen und Rhizomastiginen meist der Fall ist. Die Neubildung geschieht wohl in derselben Weise, wie nach der Excystierung. Hier entsteht, wie Fig. 13, Taf. 4, zeigt, durch heteropole Mitose des Cariosoms der Basalkörper und Rhizoplast ; die Bildung der eigentlichen Geissel dürfte dann entsprechend durch eine zweite derartige heteropole Spindel entstehen.

In den Anfangsstadien der Teilung sieht man öfters eine doppelte Geissel (Taf. 4, Fig. 6, 8), resp. eine an der Spitze gegabelte Geissel. (Taf. 4, Fig. 7). Da diese Bilder sicherlich nicht mit der Neubildung oder Teilung der Geissel in Zusammenhang stehen, so glauben wir, dass sie mit der Auflösung derselben etwas zu tun haben, wobei eine Zusammensetzung aus mehreren Fibrillen zu Tage tritt, was ja sowohl von Flagellatengeisseln, wie von den Fibrillen im Schwanz der Spermien (Ballowitz) bekannt ist.

Cysten. — Nach einiger Zeit encystiert sich das Flagellat auf der Agarplatte. Die Cyste ist eine einfache Dauercyste ; Vorgänge, die eventuell auf eine autogame Befruchtung hinwiesen, wurden nicht beobachtet. Sie ist von einer doppelten Membran umgeben und im Plasma finden sich Körner, die aus Reservestoff zu bestehen scheinen.

Systematische Stellung. — Wir rechnen das hier beschriebene Flagellat zur Gattung *Cercomonas* (Dujardin), die durch

Classificação. — Julgamos que o flajelado aqui descrito pertence ao genero *Cercomonas* Dujardin, caraterizado por unico flajelo longo, á extremidade anterior e por corpo celular dotado de movimento ameboide e com a extremidade posterior de prolongamento em fórma de cauda. Pelo fato, de que em muitos outros generos das rizomastijinas e protomonadinas se podem observar extremidades posteriores, em fórma de cauda, dotados de movimentos ameboides não póde tal elemento, como o assinalou Senn (1900) ser considerado como carateristico de genero e, por isso, Senn em seu trabalho sobre flajelados publicado no « *Natuer. Pflanzenfamilien* » de Engler e Prantl aboliu o genero *Cercomonas* e distribuiu todas as especies nelle existentes pelos generos *Mastigamoeba*, *Oicomonas* e *Cercobodo*. Já, anteriormente, Klebs considerára o *Cercomonas longicauda* Dujardin como *Cercobodo* (*Dimorpha*) *longicauda*, atendendo a que o segundo flajelo — o caudal — tinha escapado aos antigos observadores. Que é verdadeira a opinião de Klebs, já se depreende das figuras de Stein, publicadas em seu belo trabalho sobre flajelados, como *Cercomonas longicauda*; assim, o aspeto indubitavel de divizão lonjitudinal, que Stein mostra na fig. 6, da Est. I, parte V, só póde pertencer a um *Cercobodo* biflajelado. Ultimamente v. Prowazek descreveu tambem 2 flajelos para esta mesma fórma, estabelecendo tambem que saíam elles diretamente, sem rizoplasto, da membrana nuclear, como na *Mastigamoeba*. Na realidade, tal modo de inserção se dá em outras verdadeiras especies de *Cercobodo*, que mais minuciozamente estudámos e de que damos reprezentação na Fig. 14 da Est. 4. Na realidade, tal especie deve ser considerada como *Cercobodo*. Para algumas outras especies do antigo genero *Cercomonas*, que, porém, aprezentam um só flajelo, deve ser conservado o genero, em que peze á opinião contraria de Senn. Trata-se, principalmente, da especie aqui descrita e mais da *Cercomonas crassicauda* Dujardin, assim como da *Cercomonas longicauda*, que Moroff (1904) eine einzige lange Geissel am Vorderende und einen amoeboid veränderlichen Zellleib mit schwanzartigen Hinterende charakterisiert wurde. Da nun ein veränderliches, schwanzartiges Hinterende auch manchen anderen Gattungen der Rhizomastiginen und Protomonadinen zukommt, so kann dies wie Senn (1900) hervorgehoben hat, nicht als Gattungsmerkmal gelten und Senn hat daher in seiner Bearbeitung der Flagellaten in Engler und Prantl's Natürliche Pflanzenfamilien die Gattung *Cercomonas* gestrichen und ihre Arten auf die Gattungen *Mastigamoeba*, *Oicomonas* und *Cercobodo* verteilt. Früher schon hatte Klebs die *Cercomonas longicauda* Dujardin als *Cercobodo* (*Dimorpha*) *longicauda* betrachtet, indem er annahm, dass die zweite Schleppgeissel von den früheren Untersuchern übersehen worden war. Dass die Meinung von Klebs richtig ist, geht auch schon aus den Abbildungen von Stein hervor, die derselbe in seinem schönen Flagellatenwerke von der *Cercomonas longicauda* gegeben hat; denn der zweifellose Länsgsteilungszustand, den Stein in Fig. 6, Abt. V, Taf. I, abbildet, kann sich nur auf einen zweigeisselige *Cercobodo* beziehen. Neuerdings hat v. Prowazek für dieselbe Form ebenfalls zwei Geisseln beschrieben und zugleich angegeben, dass die beiden Geissel ohne Rhizoplast direkt von der Kernmembran entspringen, wie bei *Mastigamoeba*. Diese Geisselinsertion trifft in der Tat für andere echte *Cercobodo*-Arten zu, die wir näher untersucht haben und von der wir in Fig. 14, Taf. 4 eine Abbildung geben. Die Species muss daher tatsächlich zu *Cercobodo* gerechnet werden. Für einige andere Arten der alten Gattung *Cercomonas*, die aber nur eine einzige Geissel aufweisen, muss jedoch im Gegensatze zu Senn die Gattung beibehalten werden. Es handelt sich dabei hauptsächlich um die hier beschriebene Art und wohl auch um die *Cercomonas crassicauda* Duj., sowie die *Cercomonas longicauda*, die Moroff (1904) vorgelegen hat, und von der dieser Autor mit Bestimmtheit angibt, dass keine Schleppgeissel, sondern ein echter Schwanz-

observou e da qual este autor diz pozitivamente não aprezentar flajelo caudal, mas simples prolongamento caudal. Da especie de eixo variavel — *Mastigamoeba* — distingue-se o *Cercomonas* pela pronunciada monaxonia que, como vimos, depende do filamento axial e, alem disto, do modo de inserção do flajelo (corpusculo bazal com rizoplasto). Com o *Oicomonas* (Fig. 15, Est. 4) tem o *Cercomonas* de comum o numero de flajelos e o modo de inserção destes; distingue-se, porém, pelo prolongamento caudal permanente (filamento axial). Podem-se observar, tambem, nas especies de *Oicomonas* pseudopódios e mesmo prolongamento caudal, mas, este é sempre verdadeiro pseudopódio e não depende de elemento organico especial.

2. Spongomonas uvella Stein e Sp. (Rhipidodendron) splendida Stein.

Trataremos juntamente destas duas especies, porque as diferenças na organização dellas são tão pequenas que mui provavelmente se trata de especie unica. São flajelados dotados de dois flajelos de igual comprimento (*Amphimonadaceæ*) que são reunidos em colonias, por meio de envoltorio gelatinozo. Stein, bazeando-se na fórma das colonias ou, respetivamente, na de seus envoltorios gelatinozos estabeleceu trez generos diversos, e as especies que estudamos pertencem a dous desses generos, ao *Rhipidodendron* que é apenas reprezentado por uma especie *splendidum* e ao genero *Spongomonas*. O primeiro tem como caracteristica que as celulas vivem na extremidade de longos utriculos gelatinozos que correm quazi paralelamente em um só plano, um junto ao outro, formando assim colonias flabeliformes (Est. 5, Fig. 18). Contrariamente, no genero *Spongomonas* os envólucros gelatinozos nas colonias novas, são curtos, pediculados, ovais e mais tarde formam colonias arredondadas em fórma de saco ou chouriço (Est. 5, Fig. 19). De acordo com as nossas observações, os individuos celulares destes dous generos se correspondem perfeitamente, sendo, apenas, no *Rhipidodendron splendidum* de Stein um

fortsatz vorhanden sei. Von der wechselaxischen Gattung *Mastigamoeba* unterscheidet sich *Cercomonas* durch die ausgesprochene Monaxonie, die, wie vir gesehen haben, durch den Axenstab bedingt ist, ausserdem durch die Art der Geisselinsertion (Basalkorn mit Rhizoplast). Mit *Oicomonas* (Fig. 15, Taf. 4) hat *Cercomonas* zwar die Einzahl der Geissel und die Art der Geisselinsertion gemein, doch unterscheidet sie sich von ihr durch den dauernden Schwanzfortsatz (Axenstab). Wohl können auch bei *Oicomonas*-Arten Pseudopodien und dabei wohl auch ein schwanzartiges auftreten, dasselbe ist jedoch immer ein echtes Pseudopodium, nicht durch ein besonderes Organisationselement bedingt.

2. Spongomonas uvella Stein und Sp. (Rhipidodendron) splendida Stein.

Diese beiden Arten wollen wir zusammen abhandeln, weil die Unterschiede in ihrer Organisation so geringfügig sind, dass es sich sogar möglicherweise nur um eine einzige Species handelt. Es sind Flagellaten mit zwei gleichlangen Geisseln (*Amphimonadaceae*), die durch Gallerthüllen zu Kolonien vereinigt sind. Nach der Form der Kolonien resp. Gallerthüllen hat Stein drei verschiedene Gattungen aufgestellt, und die von uns untersuchten Arten gehören zweien von diesen Gattungen an, nämlich der Gattung *Rhipidodendron*, die nur durch die eine Species *splendidum* vertreten ist, und der Gattung *Spongomonas*. Die erstere wird dadurch charakterisiert, dass die Zellen in den Enden langer schlauchförmiger Gallertröhren leben, die in einer Ebene unter einander fast parallel verlaufen und somit flach fächerförmige Kolonien bilden (Taf. 5, Fig. 18). Bei der Gattung *Spongomonas* sind dagegen die Gallerthüllen bei jungen Kolonien kurz, gestielt, oval und bilden später mehr kugelige, sack- oder wurstförmige Kolonien (Taf. 5, Fig. 19).

Nach unseren Beobachtungen stimmen nun die Zellindividuen bei beiden Gattungen vollkommen überein, nur sind sie

pouco mais alongados, em consequencia da fórma do tubo gelatinozo; no *Spongomonas* são mais ovalares ou arredondados. Quando os individuos saem dos seus envólucros gelatinozos, o que comumente acontece, são todos redondos ou ameboides, e não se podem diferençar um do outro. O estabelecimento de dous generos, bazeado sómente na fórma dos envólucros gelatinozos, parece-nos carecer de baze e, mesmo, o direito de separação das especies póde ser posto em duvida, porquanto na formação do envólucro gelatinozo tivemos ocazião de ver fórmas de tranzição entre os 2 tipos. Se, não obstante, nos rezolvemos a aceitar duas especies, fazemol-o porque na *Sp.* (*Rhipidodendron*) *splendida*, as granulações do envólucro gelatinozo são sempre menores que as da *Spongomonas uvella* de STEIN.

Nesta ultima fórma incluiremos as diversas especies que STEIN colocou no seu genero *Spongomonas*, porque não nos parece ser possivel estabelecer distinção de especies bazeada nas fórmas das colonias.

ENVOLTORIO GELATINOZO. — Como o aspeto e formação do envólucro gelatinozo da colonia já foram muito bem descritos e figurados por STEIN bastam sobre ellas curtas informações, á guiza de introdução. Uma olhada sobre as figuras 18 a 20 da Est. 5 orienta, sem mais, sobre ellas. Já STEIN notára que o envólucro gelatinozo aprezenta estrutura granuloza. Como se vê em nossas figuras 18 a 20 da Est. 5 existem incluidas na substancia fundamental esféras muito conchegadas de côr pardacenta e de maior densidade; não fizemos pesquizas quimicas sobre a constituição dellas. Como já dissemos na *Spongomonas splendida* estas esféras da camada gelatinoza são menores que na *Spongomonas uvella* o que, por ora, póde ser considerado como carateristica da especie (Est. 5, Fig. 18 e 19). Não obstante, é possivel que os longos tubos gelatinozos da *Spongomonas splendida* nova se rezolvam em massas gelatinozas esfericas, o que se póde supôr por algumas observações, e que, por este processo, se formem as grandes esféras por

bei dem *Rhipidodendron splendidum* von STEIN mehr lang gestreckt infolge der Form der Gallertröhre, bei *Spongomonas* mehr oval oder kugelig. Falls die Individuen jedoch aus ihrer Gallerthülle heraustreten, was häufig vorkommt, sind sie alle kugelig oder amoeboid, und können überhaupt nicht voneinander unterschieden werden. Eine Aufstellung zweier Gattungen allein auf Grund der Gallerthülle erscheint uns daher unbegründet, ja es kann sogar die Berechtigung einer Speciestrennung in Zweifel gezogen werden, da wir in der Ausbildung der Gallerthülle auch Uebergangsformen zwischen den beiden Typen beobachtet haben. Wenn wir uns dennoch entschliessen, zwei Arten anzunehmen, so liegt der Grund darin, dass bei *Sp.* (*Rhipid.*) *splendida* die Körner der Gallerthülle stets kleiner sind als bei der STEIN'schen *Spongomonas uvella*. Unter letzten Art fassen wir die verschiedenen Arten zusammen, die STEIN zu seiner Gattung *Spongomonas* gestellt hat, da uns eine Speciesunterscheidung auf Grund der Form der Kolonie nicht durchführbar erscheint.

GALLERTHÜLLE. — Da die Form und Entstehung der kolonialen Gallerthüllen schon von STEIN treffend beschrieben und abgebildet wurde, mögen die kurzen einleitenden Angaben darüber genügen. Ein Blick auf die Figuren 18 bis 20, Taf. 5, orientiert zudem ohne Weiteres darüber.

STEIN hatte schon angegeben, dass die Gallerthülle körnig gebaut sei. Wie man in unseren Fig. 18 bis 20, Taf. 5, sieht, sind in einer Grundsubstanz dicht gedrängt Kugeln einer bräunlich aussehenden, dichteren Masse eingelagert; Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung haben wir nicht unternommen. Wie schon erwähnt, sind bei *Spong. splendida* diese Gallertkugeln stets kleiner als bei *Sp. uvella*, was vorderhand als Speciescharakter angesehen werden mag (Fig. 18 und 19). Möglich wäre es allerdings, dass die langen Gallertröhren von jungen *Sp. splendida* sich in mehr kugelige Gallertmassen umwandeln, worauf einige Beobachtungen hinweisen,

entumecimento das pequenas, havendo assim uma unica especie dellas. Só o estudo de culturas poderá elucidar a questão.

Aspeto da celula. — Na *Sp. splendida*, em virtude da fórma dos tubos gelatinozos, os individuos são alongados, cilindricos, tendo, na maioria, a extremidade anterior truncada (Fig. 18, Est. 5). Os individuos da *Spong. uvella* são ovais ou esfericos (Fig. 19, Est. 5). Muitas vezes os individuos das 2 especies abandonam seus envólucros gelatinozos e, nesse cazo, os da *Sp. splendida* aprezentam-se tambem ovais ou esfericos, como já o figurára Stein. Estes individuos livres se podem fixar a qualquer sustentaculo, a uma laminula, p. ex., e tomar então fórmas ameboides (Fig. 28 e 29, Est. 6). Formam frequentemente pequenos pseudopódios e nesse estado fazem lembrar certas especies de *Cercobodo*. Quando perdem os flajelos — o que póde acontecer, tanto dentro, como fóra do envólucro gelatinozo — é muito facil a possibilidade de confundil-os com amebas. Muitas vezes, encontrámos, tambem, unidades, assim como grupos de individuos sem flajelos, que aprezentavam pseudopódios muito longos, acuminados, dispostos como na *A. radiosa*, verdadeiros nematopodios, por meio dos quais se achavam fundidos diversos individuos, á guiza de plasmodio (Fig. 21, Est. 5). Si se não conhecesse bem a geneze dessas formações, ser-se-ia levado a acreditar que se tratava de organismos amebiformes, como uma especie de *Nuclearia*. Que, na realidade, se trata de verdadeira *Spongomonas* mostram-no, não só a estrutura do nucleo, mas, tambem, a completa concordancia da mitoze que é extremamente carateristica.

Plasma. — O plasma é grosseiramente vacuolizado, com paredes espessas, que, por sua vez, são finamente alveoladas. Não existe pelicula especial ou periplasto, e d'aí a possivel variabilidade ameboide, fóra do envólucro gelatinozo. Muitas vezes, encontram-se vacuolos nutritivos com bacterios e outros restos alimentares. Não podemos dar informação segura de como são

und dass dabei durch Aufquellung die grösseren Kugeln aus dem kleinen entstünden, mithin doch nur eine Art vorläge. Darüber können nur genauere Zuchtversuche entscheiden.

Gestalt der Zelle. — Bei *Sp. splendida* sind die Individuen entsprechend der Form der Gallertröhre lang gestreckt, cylindrisch, am Vorderende meist etwas abgestutzt (Fig. 18, Taf. 5). Die Individuen von *Sp. uvella* sind oval oder kugelig (Fig. 19, Taf. 5). Häufig verlassen die Individuen beider Arten ihre Gallerthülle und in diesem Fall sind auch die von *Sp. splendida* oval oder kugelig, wie sie auch schon Stein abgebildet hat. Diese freien Individuen können sich nun auf irgend einer Unterlage, z. B einem Deckgläschen festsetzen und nehmen dann amoeboide Formen an (Fig 28 u. 29, Taf. 6). Sie bilden dabei meist nur ganz kurze Pseudopodien und in diesem Zustande erinnern sie an gewisse *Cercobodo*-Arten. Wenn sie dagegen, was sowohl innerhalb der Gallerthülle, als ausserhalb derselben häufig vorkommt, die Geissel verloren haben, ist leicht eine Verwechslung mit Amoeben möglich. Mehrmals fanden wir auch einzelne, sowie Gruppen von geissellosen Individuen, die sehr lange zugespitzte *radiosa*artige Pseudopodien resp. Filopodien aufwiesen, wobei verschiedene Individuen sogar plasmodial verschmolzen waren (Fig. 21, Taf. 5). Wenn man nicht die genaue Genese dieser Formen kennen würde, würde man sie unbedingt für amoebenartige Organismen, etwa eine *Nuclearia*-Art halten. Dass sie aber tatsächlich zu *Spongomonas* gehören, zeigt nicht nur der Bau des Kernes, sondern auch die vollständige Uebereinstimmung der äusserst charakteristischen Mitose.

Plasma. — Das Plasma ist ziemlich grob vakuolär mit dicken, ihrerseits wieder fein wabigen Wänden. Eine besondere Pellicula oder Periplast fehlt, daher auch die Fähigkeit ihrer amoeboiden Veränderlichkeit ausserhalb der Gallerthülle. Oefters findet man Nahrungsvakuolen mit Bakterien und anderen Nahrungsresten. Ueber die Art

injeridos os alimentos; assim mesmo, podemos supôr que, no estado de liberdade, os alimentos sejam apreendidos por todos os lados do corpo, como nas amebas, emquanto no interior do envólucro gelatinozo a tomada dos alimentos só se faça pela extremidade anterior livre.

Flajelos. — Os flajelos são pares e de igual comprimento; ás vezes se acham aderentes á porção inferior, o que revela o fato de que existem fibras de esqueleto, que foram revestidas de camada de plasma liquido, como se tem verificado em diversos flajelos dos flajelados. Nacem na extremidade anterior da celula, apoz pequeno percurso intracelular, de dupla granulação bazal (diplozoma) que, na maioria das vezes se acha afastada completamente do nucleo (Est. 5, Fig. 22 e Est. 6, Fig. 28 e 30). A's vezes e, sobretudo, por ocazião de formação de novos flajelos, p. e., apoz a divizão, o diplozoma se acha ligado ao cariozoma do nucleo por meio do rizoplasto (Est. 6, Fig. 27 e 44). Como tal aspeto é encontrado, justamente, por ocazião da formação do flajelo, póde ser elle considerado tipico, como acontece, de modo geral, entre as protomonadinas; a figura habitual de inserção do flajelo sem rizoplasto póde ser atribuida a ulterior dissolução deste. Além dessas duas inserções normais dos flajelos existe ainda terceira, muito mais rara, em que o diplozoma está diretamente situado sobre a membrana nuclear (Est. 5, Fig. 26 e Est. 6, Fig. 29). Neste cazo, a membrana nuclear póde ser distendida sob a fórma de prolongamento afilado (Est. 5, Fig. 26). Este modo de inserção corresponde, assim, com a observada nas rizomastijinas. E' possivel que se trate aqui tambem de aproximação ulterior do diplozoma apoz dissolução do rizoplasto. Outra possibilidade muito plauzivel de interpretação desse modo de inserção do flajelo será discutida quando tratarmos da divizão nuclear.

Nucleo. — O nucleo é tambem aqui o nucleo veziculozo tipico dos flajelados, com grande cariozoma. E' separado do

der Nahrungsaufnahme können wir keine sicheren Angaben machen; doch darf man wohl annehmen, dass im nackten Zustande die Nahrung allseitig nach Art der Amoeben aufgenommen wird, in der Gallerthülle dagegen nur an dem freien Vorderende.

Geisseln. — Die Geisseln sind in der Zweizahl vorhanden und gleich lang; manchmal sind sie im unteren Teil verklebt, was darauf hinweist, dass festere Skelettfäden vorhanden sind, die von einer flüssigen Plasmaschicht überzogen werden, wie das für verschiedene Flagellatengeisseln erwiesen ist. Sie entspringen im Vorderende, aber ein Stück im Innern der Zelle, von einem doppelten Basalkorn (Diplosom), das meist völlig gesondert vom Kerne ist (Taf. 5, Fig. 22 u. Taf. 6, Fig. 28 u. 30). Manchmal und zwar vor allem bei einer Neubildung der Geissel, z. B. nach der Teilung, ist das Diplosom durch einen Rhizoplasten mit dem Caryosom des Kernes verbunden (Taf. 6, Fig. 27, 44). Da solche Bilder gerade bei der Neubildung von Geisseln angetroffen werden, kann das als das Typische gelten, wie wir es ja sonst allgemein bei Protomonadinen finden,und das gewöhnliche Bild der Geisselinsertion ohne Rhizoplast kann auf nachträgliche Einschmelzung desselben zurückgeführt werden. Ausser diesen beiden normalen Arten der Geisselinsertion gibt es noch eine sehr seltene dritte, wobei das Diplosom direkt der Kernmembran aufsitzt (Taf. 5, Fig. 26 u. Taf. 6, Fig. 29). Dabei kann die Kernmembran zu einem zugespitzten Fortsatz ausgezogen sein (Taf. 5, Fig. 26). Diese Art der Insertion stimmt somit mit der der *Rhizomastiginen* überein. Doch handelt es sich hier vielleicht nur um ein nachträgliches Heranrücken des Diplosoms nach Einschmelzung des Rhizoplasten. Eine andere sehr wahrscheinliche Möglichkeit der Entstehung dieser Art der Geisselinsertion werden wir noch bei der Kernteilung besprechen.

Kern. — Der Kern ist auch hier ein typischer bläschenförmiger Flagellatenkern mit grossem Caryosom. Gegen das Plasma ist er durch eine ziemlich derbe Membran

plasma por membrana de consistencia dura. Por meio de diferenciações adequadas, póde-se caraterizar, no cariozoma, o centriolo (Est. 5, Fig. 20, 26 e Est. 6, Fig. 27).

Na maioria das vezes, a substancia cromatica se acha reunida no cariozoma, cuja estrutura é nitidamente vizivel, como formada de 2 substancias diversas (cromatina e plastina) (Est. 5, Fig. 26 e Est. 6, Fig. 28), a zona de suco nuclear é completamente sem estrutura. Muitas vezes se podem encontrar nella, tambem, paredes de linina e granulações de cromatina, estas ultimas comumente estão grupadas paralelamente ao cariozoma (Est. 5, Fig. 20 e Est. 6, Fig. 30) e se aproximam mais tarde da membrana nuclear sobre a qual formam, nas mais das vezes, depozito homojenio. Póde-se, tambem, verificar que derivam as granulações de cromatina de toda a superficie do cariozoma (Est. 5, Fig. 26). Todas essas figuras são reprezentação das variações ciclicas que se exercitam no cariozoma [Hartmann e v. Prowazek (1907)] e que aqui, são mais evidentes que no *Cercomonas*.

Multiplicação. — Na multiplicação aqui tambem os flajelos são sempre eliminados ; ao menos, na maioria dos estádios de divizão não é possivel se ver nem vestijio de flajelo e, sobretudo, nunca nos estádios primordiais. Se nos estádios mais adiantados elles aparecem, trata-se, como ainda veremos, de nova formação. A divizão nuclear começa com a divizão do centriolo, de modo que logo no principio os centriolos filhos, como no *Cercomonas*, fazem saliencia dos lados opostos do cariozoma (Est. 6, Fig. 31). No cariozoma póde-se agora observar, sua separação em 2 partes : substancia acromatica (plastina) e blócos compactos de cromatina (Est. 6, Fig. 31 e 32) e simultaneamente se nota a perda da fórma esferica (Est. 6, Fig. 32-33). Nestes estádios, vê-se claramente que os centriolos filhos se acham ligados entre si por delgada centrodesmoze. Forma-se, então, á custa das massas de cromatina que já anteriormente se tinham disposto em fórma de anel, abgegrenzt. Im Caryosom kann man bei geeigneter Differenzierung ein Centriol nachweisen (Taf. 5, Fig. 20, 26, Taf. 6, Fig. 27). Meist ist alle färbbare Substanz im Caryosom vereinigt, dessen Zusammensetzung aus zwei verchiedenen Substanzen (Chromatin und Plastin) zu Zeiten recht deutlich ist (Taf. 5, Fig. 26, Taf. 6, Fig. 28) ; die Kernsaftzone ist dann ganz strukturlos. Oft kann man auch in ihr Lininwände und Chromatinkörner beobachten ; letztere umgeben vielfach in einer parallelen Zone das Caryosom (Taf. 5, Fig. 20 u. Taf. 6, Fig. 30) und rücken später an die Kernmembran, wo sie meist einen gleichmässigen Belag bilden. Manchmal kann man auch die Ablösung der Chromatinkörner an der ganzen Oberfläche des Caryosoms beobachten (Taf. 5, Fig. 26). Alle diese Bilder sind der Ausdruck von zyklischen Veränderungen, die sich am Caryosom abspielen (Hartmann u. v. Prowazek 1907), die hier deutlicher zu Tage treten als bei der *Cercomonas*.

Fortpflanzung. — Bei der Fortpflanzung werden auch hier die Geisseln stets abgeworfen ; wenigstens ist bei den meisten Teilungsstadien keine Spur einer Geissel zu beobachten, vor allem nie in den frühen Stadien. Wenn in späteren Stadien solche vorkommen, dann handelt es sich aber, wie wir noch sehen werden, um Neubildung.

Die Kernteilung beginnt mit der Teilung des Centriols, wobei die Tochtercentriole, wie bei *Cercomonas*, zunächst über die Caryosomgrenze an entgegengesetzten Seiten hinausragen (Taf. 6, Fig. 31). An dem Caryosom kann man nun die Sonderung in zwei Partien, eine mehr achromatische Substanz (Plastin) und compaktere Chromatinbrocken beobachten (Taf. 6, Fig. 31, 32) und gleichzeitig verliert es auch seine kugelige Gestalt (Taf. 6, Fig. 32, 33). An diesen Stadien sieht man deutlich, dass die Tochtercentriole durch eine feine Centrodesmose verbunden sind. Nun bildet sich aus den chromatischen Brocken, die schon vorher ziemlich ringförmig angeordnet waren (Fig. 33), eine ringförmige Aequatorialplatte, während der achromatische

uma placa equatorial anular, emquanto a porção acromatica de plastina constitue em torno da centrodesmoze o fuzo central, ficando, então, de novo invizivel esse filamento (Est. 5, Fig. 22 e 23 e Est. 6, Fig. 34 a 36). Assim se forma a figura de mitoze, em extremo carateristica para nosso genero, na qual as placas cromozomicas vistas de perfil excedem muito o respetivo fuzo (fuzo central). E' digno de nota que nesse estádio os centriolos na maioria já se dividiram de novo (Est. 6, Fig. 34 a 36). Aliaz, a divizão precoce do centriolo já foi observada em outros protozoarios (v. Prowazek 1908, Hartmann e Hammer 1909) e é, talvez, uma condição geral. Aqui ella se relaciona eventualmente com a formação do flajelo.

Como dissemos, a placa equatorial forma anel compacto, e só com forte diferenciação se póde verificar ser ella constituida de granulos izolados — cromozomios. Não foi possivel determinar-lhes o numero, tão compactamente aderentes e tão pequenas são essas granulações. Mais tarde, espessa-se a placa equatorial, sinal de inicio da sua divizão e vê-se por leves incizuras perifericas que já se perfez a duplicação (Est. 6, Fig. 35). Breve, este fato se torna mais claro, mercê da formação de tenue fenda lonjitudinal (Est. 6, Fig. 37), dando-se então a completa separação das placas filhas. (Est. 6, Fig. 38).

Até o referido estádio a membrana tinha conservado sua fórma esferica primitiva, a figura completa de divizão, assim como os centriolos já novamente divididos se acham dentro della (Est. 5, Fig. 22 e Est. 6, Fig. 34 a 37). Daqui por diante começa a se dissolver, como mostra a Fig. 38 da Est. 6, onde se vê apenas conservada na porção inferior e esquerda, parte da membrana. O fuzo jaz, então, inteiramente no plasma e estira-se fortemente, em sentido lonjitudinal, em virtude do crecimento da porção do fuzo existente entre as 2 placas filhas (Est. 6, Fig. 39). A hipoteze do crecimento da parte media do fuzo para concluzão da mitoze, parece-nos, á vista da

Plastinteil um die Centrodesmose eine centrale Spindel bildet, wobei erstere nun wieder unsichtbar wird (Taf. 5, Fig. 22, 23 u. Taf. 6, Fig. 34 bis 36). So entsteht eine für unsere Gattung äusserst charakteristische Mitosefigur, bei der die Chromosomenplatte in Seitenansicht die eigentliche Spindel (Centralspindel) weit überragt. Bemerkenswert ist, dass in diesen Stadien die Centriolen meist schon wieder geteilt sind (Taf. 6, Fig. 34 bis 36). Die frühzeitige Teilung der Centriolen ist neuerdings auch sonst bei Protozoen beobachtet (v. Prowazek 1908, Hartmann und Hammer 1909) und vielleicht von allgemeiner Bedeutung. Hier steht sie eventuell mit der Geisselbildung in Beziehung.

Die Aequatorialplatte bildet, wie gesagt, einen kompakten Ring ; nur bei starker Differenzierung kann man sehen, dass sie sich aus einzelnen Körnern, Chromosomen, zusammensetzt ; doch war uns bei der Kleinheit des Objekts und der kompakten Verklebung der Chromosomen eine Zählung nicht möglich. Später verdickt sich die Aequatorialplatte, ein Zeichen ihrer beginnenden Teilung und man sieht an leichten peripheren Einkerbung (Taf. 6, Fig. 35), dass die Verdoppelung schon stattgefunden hat. Bald wird sie durch einen feinen Längsspalt noch deutlicher (Taf. 6, Fig. 37) und die vollständige Trennung in die Tochterplatten tritt ein (Taf. 6, Fig. 38).

Bis zu diesen Stadien war die Kernmembran in ihrer ursprünglichen kugeligen Form erhalten, die ganze Teilungsfigur sammt den schon wieder geteilten Centriolen befand sich innerhalb derselben (Taf. 5, Fig. 22 u. Taf. 6, Fig. 34—37). Von nun an beginnt sie sich aufzulösen, wie Fig. 38, Taf. 6, zeigt, wo nur noch an der unteren linken Seite ein Teil der Membran erhalten ist. Die Spindel liegt jetzt ganz im Plasma und streckt sich durch Wachstum der zwischen den Tochterplatten gelegenen Partie der Spindel stark in die Länge (Taf. 6, Fig. 39). Die Annahme eines Wachstums des mittleren Spindelteiles zur Durchführung der Mitose scheint uns in Anbetracht der hier vorliegenden Bilder

figura a que aludimos, absolutamente necessaria, ficando excluida outra qualquer explicação mecanica. Seja ainda acentuado que o crecimento se póde dar mais ativamente num dos lados, o que produz a incurvação da figura do fuzo (Est. 6, Fig. 39). Começa, então, a dissolução deste e a reconstrução dos nucleos filhos. A parte media do fuzo retrae-se (Est. 6, Fig. 40) o que de novo permite que se veja a centrodesmoze (Est. 6, Fig. 40 e 41). Esta se conserva por mais tempo e, ás vezes, é ainda vizivel apoz a formação dos nucleos filhos (Est. 6, Fig. 43). Em outros cazos, toda a parte media do fuzo, juntamente com a centrodesmoze são rapidamente dissolvidas e vê-se entre os nucleos filhos, em trabalho de reconstrução, apenas uma zona plasmatica granuloza um pouco mais intensamente córada, emquanto os cónes polares do fuzo, ainda se acham conservados no interior das novas membranas nucleares (Est. 6, Fig. 42).

A reconstituição dos nucleos filhos faz-se do seguinte modo: em torno das placas filhas, que, na maioria, ainda conservam seus cónes nucleares forma-se nova zona de suco nuclear e que se limita com o plasma por meio duma membrana. Dá-se a involução do cóne do fuzo, (Est. 6, Fig. 40, á esquerda, 41 e 43) e o centriolo coloca-se na placa filha — que perde, ao mesmo tempo, a forma alongada e se transforma em cariozoma esferico, — ficando a principio colada fóra della (Est. 6, Fig. 43, á esquerda) e vólta mais tarde para o interior do cariozoma (Est. 6, Fig. 43, á direita e 44).

Os novos flajelos, em regra, formam-se só depois do termo da divizão nuclear, sendo que o cariozoma se divide heteropolarmente, e perpendicularmente ao eixo da divizão anterior, formando-se assim um rizoplasto e os corpusculos bazais (Est. 6, Fig. 44, á direita). Como já, por ocazião da mitoze, existissem 2 centriolos, póde-se pensar em 2 modalidades: ou, por ocazião dessa divizão heteropolar os mesmos foram apenas distribuidos, sendo preunabweislich und eine andere mechanische Erklärung ausgeschlossen. Hervorgehoben sei noch, dass das Wachstum auf einer Seite stärker sein kann, wodurch eine gebogene Spindelfigur entsteht (Taf. 6, Fig. 39).

Nun beginnt die Auflösung der Spindel und die Rekonstruktion der Tochterkerne. Der mittlere Teil der Spindel schrumpft zusammen (Taf. 6, Fig. 40), wobei die Centrodesmose wieder zu Tage treten kann (Taf. 6, Fig. 40 u. 41). Letztere bleibt am längsten erhalten und ist manchmal noch nach Neubildung der Tochterkerne wahrzunehmen (Taf. 6, Fig. 43). In anderen Fällen wird der ganze mittlere Teil der Spindel sammt der Centrodesmose sehr rasch aufgelöst und man sieht zwischen den in Rekonstruktion begriffenden Tochterkernen nur eine etwas dunkler gefärbte körnige Plasmazone, während die polaren Kegel der Spindel inerhalb der neuen Kernmembranen noch erhalten sind (Taf. 6, Fig. 42).

Die Rekonstruktion der Tochterkerne geschieht in der Weise, dass sich um die Tochterplatten mit ihren meist noch erhaltenen Spindelkegeln eine neue Kernsaftzone bildet und sich durch eine Membran gegen das Plasma abgrenzt. Der Spindelkegel bildet sich dann zurück (Taf. 6, Fig. 40 links, 41 und 43) und das Centriol liegt der Tochterplatte, die gleichzeitig ihre gestreckte Form verliert und sich zu einem kugeligen Caryosom umwandelt, anfangs aussen noch an (Taf. 6, Fig. 43 links) und rückt später in das neue Caryosom hinein (Taf. 6, Fig. 43 rechts, 44).

Die neuen Geisseln werden in der Regel erst nach vollendeter Kernteilung gebildet, indem das Caryosom sich heteropol teilt und zwar senkrecht zur vorausgegangenen Kernteilungsaxe, wodurch ein Rhizoplast und die Basalkörper (Diplosom) entstehen (Taf. 6, Fig. 44 rechts). Da schon bei der Mitose Doppelcentriolen vorhanden waren, sind zwei Möglichkeiten denkbar: entweder sind dieselben bei dieser heteropolaren Teilung einfach verteilt worden, wobei der eine Pol (Basalkörper) zur Bildung des Diplosoms sekundär eine zweite

cizo que um dos pólos (corpusculo bazal) para formar o diplozoma se dividisse segunda vez, ou então, os duplos centriolos se dividiram simultaneamente e formaram, assim, diretamente o diplozoma. Os dous centriolos restantes apareceriam, então, no estado de repouzo do nucleo, consecutivamente á intima contiguidade em que se acham, como centriolo unico (Est. 5, Fig. 26).

Em ambos os cazos o modo de formação dos flajelos concorda, em principio, com o do *Cercomonas*. Além disso, observa-se ainda um segundo modo muito interessante em que, já no estádio da placa equatorial, se formam, dos centriolos, novos flajelos filhos. Neste cazo, o nucleo e o fuzo se dislocam inteiramente para a superficie da celula, ficando o eixo lonjitudinal do fuzo transversalmente colocado á superficie da celula (Est. 5, Fig. 23 e Est. 6, Fig. 36). O fuzo, especialmente seus pólos, dentro da cavidade nuclear, mais ainda se aproxima da superficie celular o que faz com que tenha dispozição obliqua (Est. 5, Fig. 23). Nos pólos (centriolos) nota-se um ou dous flajelos. Formação dos flajelos á custa dos centriolos, durante a mitoze só foi observada até agora uma só vez por Berliner (1909) em um flajelado, a euglenoidea *Copromonas major* e ainda aí todo o processo se completa no interior do protoplasma. As figuras encontradas na *Spongomonas* lembram extraordinariamente as assinaladas por Meves na espermatojéneze da borboleta *Phalaena bucephala*, em que, na mitoze dos espermatócitos de 1.ª ordem se encontram 2 flajelos, os futuros filamentos axiais das espermias, apensos aos duplos centriolos.

Apoz a reconstituição dos nucleos filhos os flajelos, no principio, nacem do nucleo, por isso que o diplozoma ainda se acha em contato com o cariozoma recemconstituido (Est. 5, Fig. 24, em cima), depois, afasta-se do nucleo para o plasma, estabelecendo-se, assim, a inserção normal do flajelo (Est. 5, Fig. 24, em baixo). Talvez a maneira de se inserir dos flajelos na membrana nuclear, acima descrita (Est. 5,

Teilung erfahren müsste; oder aber die doppelten Centriole teilen sich gleichzeitig und bilden so direkt das Diplosom. Das zurückgebliebene Doppelcentriol würde dann im Ruhestadium des Kernes infolge fester Aneinanderlagerung scheinbar als einfaches Centriol (Taf. 5, Fig. 26) erscheinen. Bei beiden Möglichkeiten stimmt der Modus der Geisselentstehung prinzipiell mit dem von *Cercomonas* überein.

Daneben kommt aber noch ein sehr interessanter zweiter Modus vor, indem schon im Stadium der Aequatorialplatte die neuen Tochtergeisseln von den Centriolen aus gebildet werden. In diesem Falle rückt der Kern mit der Spindel ganz an die Oberfläche der Zelle, wobei sich die Längsaxe der Spindel quer zur Zelloberfläche einstellt (Taf. 5, Fig. 23 u. Taf. 6, Fig. 36). Die Spindel, speziell ihre Pole, ist ausserdem innerhalb der Kernhöhle noch mehr an die Seite der Oberfläche verschoben, sodass sie ein schiefes Aussehen darbietet (Taf. 5, Fig. 23). An den Polen (Centriolen) bemerkt man eine oder zwei Geisseln. Eine Entstehung der Geisseln von den Centriolen während der Mitose hat bisher nur Berliner (1909) bei einem Flagellaten, der Euglenoidee *Copromonas major* beobachtet, doch vollzieht sich der Vorgang dort ganz im Innern des Protoplasmas. Die bei *Spongomonas* gefundenen Bilder erinnern ausserordentlich an die, welche Meves von der Spermatogenese des Schmetterlings *Phalaena bucephala* gegeben hat, wo bei der Mitose der Spermatocyten erster Ordnung ebenfalls zwei Geisseln, die künftigen Axenfäden der Spermien an den doppelten Centriolen sich finden. Nach Rekonstruktion der Tochterkerne entspringen die Geisseln zunächst noch aus dem Kerne, indem das Diplosom noch dem neu gebildeten Caryosom anliegt (Taf. 5, Fig. 24 oben); nachträglich rückt es aus dem Kerne ins Plasma, wodurch wir die normale Geisselinsertion erhalten (Taf. 5, Fig. 24 unten). Vielleicht ist die oben beschriebene Art der Geisselinsertion an der Kernmembran (Taf. 5, Fig. 25 u. Taf 6, Fig. 29) auf diesen Modus der Geisselbil-

Fig. 25 e Est. 6, Fig. 29) se relacione a este modo de formação dos flajelos em que o diplozoma ao sair do nucleo permanece nesse logar. Infelizmente, por cauza da pequenez do objeto não pudemos descobrir se existem nos pólos do fuzo, por ocazião desta formação dos flajelos, 2, 3 ou 4 centriolos. Inclinamo-nos a aceitar uma das 2 ultimas hipotezes, porquanto já no estado de completa formação (Est. 5, Fig. 24, em baixo e 25) existem 3 centriolos, o do cariozoma e os 2 do diplozoma.

O fuzo nuclear acha-se colocado na celula, em raros cazos, no começo, no sentido do seu eixo lonjitudinal (*Spongomonas splendida*) (Est. 5, Fig. 22) as mais das vezes transversalmente (Est. 5, Fig. 23 e Est. 6, Fig. 36). Isto pode constituir a regra para as fórmas esfericas ; em todo o cazo os novos flajelos e o plano de divizão celular são sempre perpendiculares ao eixo do fuzo (Est. 6, Fig. 36, 44 e 45). Por conseguinte a divizão celular póde ser considerada como divizão lonjitudinal. Na *Spongomonas splendida* encontrámos, ao contrario, os nucleos filhos quazi sempre um atraz de outro no sentido do eixo lonjitudinal da celula (Est. 5, Fig. 24 e 25). Aqui tambem a forma dos cariozomas (placas filhas) muitas vezes parece indicar que, se tendo dado a divizão do nucleo no sentido lonjitudinal, em virtude da falta de espaço decorrente da fórma do envoltorio gelatinozo, dá-se uma inversão de logar (Est. 5, Fig. 25). Nessas fórmas não vimos estádios da divizão celular ; provavelmente se dá aqui uma divizão mais obliqua, aproximando-se da divizão transversa, cauzada pela angustia de espaço no interior do tubo gelatinozo.

Classificação. — Já manifestámos, em começo, nossa opinião respeito á situação de nossa forma em determinado genero e especie. Não podemos decidir se *Cladomonas*, o 3.º genero deste grupo estabelecido por Stein, é justificado, porque não encontrámos tais formas. Stein formou para os seus 3 generos uma familia especial, as *Spongomonadinæ*, no que foi seguido por Buetschli (1883—1887) e por

dung zurückzuführen, indem das Diplosom beim Herausrücken aus dem Kerne an dieser Stelle liegen bleibt. Leider konnten wir bei der Kleinheit des Objektes nicht ermitteln, ob an den Polen der Spindel zwei, drei oder vier Centriolen bei dieser Geisselbildung vorhanden sind. Wir sind geneigt eine der beiden letzteren Möglichkeiten anzunehmen, da ja im ausgebildeten Zustand (Taf. 5, Fig. 24 unten u. 25) unbedingt drei Centriole vorhanden sind, nämlich das des Caryosoms und die beiden des Diplosoms.

Die Kernspindel liegt in der Zelle in seltenen Fällen anfangs in der Längsaxe *Spongomonas splendida* (Taf. 5, Fig. 22), meist quer zu ihr (Taf. 5, Fig. 23 u. Taf. 6, Fig. 36). Letzteres mag für die kugeligen Formen wohl allgemein gelten, jedenfalls stehen die neuen Geisseln und die Zellteilungsebene immer senkrecht zur Spindelaxe (Fig. 36, 44, 45). Die Zellteilung kann mithin als eine Längsteilung gelten. Bei *Spongomonas splendida* fanden wir dagegen die Tochterkerne fast immer hinter einander in der Längsaxe der Zelle (Fig. 24, 25).

Doch deutete auch hier vielfach die Form der Caryosome (Tochterplatten) darauf hin, dass die Kernteilung quer zu Längsaxe vor sich gegangen ist und erst nachträglich infolge des durch die Gallertröhre bedingten Platzmangels eine Verschiebung stattgefunden hat (Fig. 25). Stadien der Zellteilung haben wir bei dieser Form nicht gesehen, vermutlich ist es eine mehr schiefe, der Querteilung sich nähernde Teilung, verursacht durch den engen Raum in der Gallertröhre.

Systematische Stellung. — Unsere Meinung bezüglich der Art- und Gattungszugehörigkeit unserer Formen wurde schon einleitend auseinandergesetzt. Ob *Cladomonas*, die dritte hierher gehörige Gattung von Stein als solche berechtigt ist, können wir nicht angeben, da wir diese Form nicht antrafen. Stein hat für seine drei Gattungen eine eigene Familie aufgestellt, die *Spongomonadinen*, worin ihn Buetschli (1883-1887) und Blochmann folgten. Da-

Blochmann. Contrariamente, já Senn declarou que pela estrutura celular estas formas correspondiam ás *Amphimonadaceæ*, devendo-se considerar como secundaria a secreção gelatinoza. Concordamos com elle em que essas formas devam entrar para a familia das « *Amphimonadaceæ* ».

3. Cyathomonas truncata. Fres.

Este flajelado já foi estudado por Buetschli e Fisch (1885) que já estabeleceram perfeitamente sua estrutura. Aqui transcrevemos simplesmente a descrição que delle faz Senn, segundo as observações daquelles autores :

« Oval, cortado obliquamente na extremidade anterior, fortemente comprimido dos lados, rijo. Comprimento : 16 a 23 μ. A' extremidade anterior do corpo, flajelos do comprimento de $^2/_3$ do corpo, que batem contra a porção anterior, truncada do corpo. Este se aprofunda numa cavidade que contem a abertura bucal que é de cada lado cercada duma serie de granulações refrinjentes ; esse anel bucal, visto de perfil aparece como uma listra escura. Periplasto bastante compacto, lizo. Abaixo do anel uma especie de escavação bucal. Um vacuolo contrátil no angulo obtuzo da extremidade anterior. Nucleo veziculozo, um pouco para traz do meio do corpo, aproximando-se da borda que sustenta o flajelo (face dorsal). Movimentos natatorios livres, ficando o maior dos eixos laterais em plano horizontal. Descreve habitualmente circulos. Pela parte anterior absorve alimentos solidos (bacterios etc.) Divizão lonjitudinal ».

Em alguns pontos apenas, temos que completar esta descrição da estrutura.

Plasma. — O plasma é bastante alveolado, geralmente dotado de grandes vacuolos que bastas vezes encerram restos alimentares (Est. 7, Fig. 46). Fisch notou que o interior da celula é atravessado por septos de substancia fortemente córavel. Não vimos tais figuras, não só nos preparados a fresco, como nos córados. O

gegen hatte schon Senn betont, dass diese Formen im Zellbau mit den *Amphimonadaceen* übereinstimmen und die Gallertausscheidung als sekundär zu betrachten ist. Wir sind mit ihm der Meinung, dass diese Formen in die Familie der *Amphimonadaceen* einzureihen sind.

3. Cyathomonas truncata Fres.

Dieses Flagellat ist schon von Buetschli und Fisch (1885) studiert worden, die seinen Bau treffend geschildert haben. Wir setzen einfach die Beschreibung hierher, die Senn nach den Befunden dieser Autoren gegeben hat :

« Oval, vorn schief abgestutzt, seitlich stark zusammen gedrückt, starr. Länge : 16 bis 23 μ. An der vorderen Körperspitze zwei drittelkörperlange gegen das abgestützte Vorderende hinschlagende Geisseln. Letzteres augehöhlt, im Grunde die Mundöffnung enthalted, welche jederseits von einer Reihe stark lichtbrechenden Körner umschlossen ist ; dieser Mundring erscheint in der Seitenansicht als dunkler Strich. Periplast ziemlich fest, glatt. Unterhalb des Mundringes eine Art Schlundhöhlung. Eine kontraktile Vakuole in der stumpfen Ecke des Vorderendes. Kern bläschenförmig, etwas hinter der Körpermitte, dem die Geissel tragenden Rande (Rückenseite) genähert. Freie Schwimmbewegung, wobei die Breitseite horizontal liegt. Gewöhnlich Kreise beschreibend. Aufnahme fester Nahrung (Bakterien etc.) am Vorderende. Längsteilung. »

Diese Beschreibung des Baues haben wir nur in einigen Punkten zu ergänzen.

Plasma. — Das Plasma ist ziemlich feinwabig, aber meist mit grösseren Vakuolen durchsetzt, die vielfach Nahrungsreste enthalten (Taf. 7, Fig. 46, etc.). Fisch hat angegeben, dass das Zellinnere von Balken stark färbarer Substanz durchzogen werde. Solche Bilder haben wir weder im Leben noch im gefärbten Präparate gesehen ; was Fisch abbildet, sind wohl nur stärkere Plasmapartien um grös-

que Fisch figurou, provavelmente, não são mais que as porções do plasma em torno de grandes vacuolos e que talvez, em virtude de má fixação podem aprezentar tal aspeto.

No que respeita ao anel bucal, acrecente-se que é constituido de substancia homojenia que circunda a boca á maneira de ferradura, cujos ramos se acham voltados para os corpusculos bazais e, muitas vezes a elles se apoiam; em cada ramo, acham-se incluidos cerca de 2 a 4 granulos alongados; do lado fechado (ventral) encontra-se na maioria das vezes uma placa maior da mesma substancia (Est. 7, Fig. 48). Da rejião dos flajelos para o lado truncado as granulações aumentam de tamanho (Est. 7, Fig. 46, 49, 51 e 56). Granulações e placa córam-se fortemente pela hematoxilina férrea. Nada podemos adiantar sobre a orijem e natureza dessas formações, porquanto sobre isto não fizemos estudos especiais. Seria interessante verificar si ellas não se relacionam a cromidios ou mitocondrios.

Flajelos. — Os 2 flajelos de igual tamanho nacem do corpusculo bazal duplo (diplozoma), que, como na *Spongomonas*, se acha ligado ao cariozoma por meio de rizoplasto (Est. 7, Fig. 47 e 49). Contrariamente ao que se observa na *Spongomonas* o diplozoma guarda sempre sua pozição na extremidade anterior do lado mais longo do animal, e, tambem, só excecionalmente o rizoplasto dezaparece antes da divizão. Sómente, a porção deste que se prende ao nucleo (Est. 7, Fig. 46) ou, melhor, ao cariozoma (Est. 7, Fig. 49) parece dissolver-se ás vezes, o que, provavelmente, se relaciona com as variações ciclicas.

Nucleo. — O nucleo de *Cyathomonas* é tambem nucleo veziculozo, com grande cariozoma. Contrariamente ao que se observa nas fórmas já descritas, encontram-se tambem constantemente granulações de cromatina na zona de suco nuclear; ao menos, já se nota depozito de tais granulações sobre a membrana nuclear (Est. 7, Fig.

sere Vakuolen, die bei schlechter Fixierung ein derartiges Aussehen erhalten mögen.

Bezüglich des Schlundringes sei hinzugefügt, dass derselbe aus einer homogenen Substanz besteht, die hufeisenförmig den Schlund umzieht, wobei die offenen Schenkel gegen die Basalkörper gerichtet sind und sich häufig ihnen anlegen, und in die jederseits circa zwei bis vier lang gestreckte Körner eingelagert sind; an der geschlossenen Seite (Bauchseite) liegt meist eine grössere Platte derselben Substanz (Taf. 7, Fig. 48). Von der Geisselseite zu der abgestutzten kürzeren Seite hin nehmen die Körner an Grösse zu (Taf. 7, Fig. 46, 49, 51, 56). Körner und Platte färben sich stark mit Eisenhämatoxylin. Ueber die Natur und die Herkunft dieser Gebilde können wir keine Angaben machen, da wir keine besonderen Untersuchungen darüber angestellt haben. Es wäre von Interesse festzustellen, ob sie nicht mit Chromidien oder Mitochondrien etwas zu tun haben.

Geisseln. — Die beiden gleich langen Geisseln entspringen von einem Doppelbasalkorn (Diplosom) und das wie bei Spongomonas durch einen Rhizoplasten mit dem Caryosom des Kernes in Verbindung steht (Taf. 7, Fig. 47, 49). Im Gegensatz zu *Spongomonas* behält das Diplosom immer seine Lage am Vorderende der längeren Seite des Tieres bei und auch der Rhizoplast ist nur ausnahmsweise (vor der Teilung) rückgebildet. Nur der im Kern (Taf. 7, Fig. 46) resp. im Caryosom (Taf. 7, Fig. 49) verlaufende Teil desselben scheint öfters aufgelöst zu werden, was wohl mit den zyklischen Veränderungen zusammenhängt.

Kern. — Auch der Kern von *Cyathomonas* ist ein bläschenförmiger Kern mit grossem Caryosom. Doch sind im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Formen auch in der Kernsaftzone stets Chromatinkörner vorhanden; mindestens findet sich ein Belag von solchen an der Kernmembran (Taf. 7, Fig. 46, 47, etc.). Sehr schön kann man bei dieser Form die Entstehung dieser Chromatinkörner im Aussenkern durch zyklische Abschnürungen vom Caryosom

46, 47). Póde-se observar nitidamente nesse protozoario a formação de tais granulos de cromatina no nucleo exterior, por estrangulamentos ciclicos do cariozoma. Neste processo o cariozoma intumece na periferia, formando-se em torno da zona central compacta uma zona acromatica, que, porem, se acha ainda separada da zona de suco nuclear pela membrana cariozomica primitiva, incluindo granulos de cromatina (Est. 7, Fig. 49 e 50). Esta zona acromatica externa dissolve-se depois e as granulações cromaticas espalham-se no nucleo exterior (Est. 7, Fig. 51). Identico processo se póde repetir com a porção restante do cariozoma. As variações ciclicas que se dão no cariozoma são aqui, morfolojicamente, de nitidez tal, que, iguais, quazi que só foram observadas, até agora, na *Entamoeba tetragena* (Hartmann 1908). Observámos em certos preparados, algumas vezes, nucleos enormemente intumecidos que se nos afiguraram, em tudo, como patolojicos e comparaveis aos aspetos descritos por Richard Hertwig, de dejeneração fiziolojica do nucleo dos protozoarios.

Multiplicação. — No começo da divizão nuclear encontra-se na zona de suco nuclear apenas fino depozito cromatico sobre a membrana exterior que, tambem, mais tarde dezaparece (Est. 7, Fig. 53). Tambem neste cazo o processo de mitoze se passa excluzivamente no cariozoma. Este mostra, como nas variações ciclicas, zona acromatica periferica, mas o limite primitivo do cariozoma encerra apenas vestijios de cromatina. Todo o nucleo e principalmente esta zona periferica do cariozoma se alonga, emquanto a parte central permanece compacta e esferica (Est. 7, Fig. 53). O alongamento da porção periferica continúa até que, no meio, tenha apenas a largura da parte central, formando-se assim figura de fuzo em cujos pólos acuminados aparecem agora os centriolos que antes, não eram diferenciaveis (Est. 7, Fig. 54 a 56). Vimos uma vez em tal fuzo acromatico ainda granulações cromaticas (Est. 7, Fig. 54). Em regra, porem, é elle inteiramente acromati

beobachten. Dabei bläht sich das Caryosom an der Peripherie auf, sodass um einen zentralen kompakten Caryosomteil eine achromatische Zone entsteht, die aber noch von der ursprünglichen Caryosommembran, in die chromatische Körner eingelagert sind, gegen die Kernsaftzone abgegrenzt ist (Taf. 7, Fig. 49, 50). Dann löst sich diese achromatische peripherische Zone und die chromatischen Körner zerstreuen sich im Aussenkern (Taf. 7, Fig. 51). Derselbe Prozess kann sich an dem Caryosomreste dann wiederholen. Die sich am Caryosom abspielenden zyklischen Vorgänge sind hier morphologisch von einer Deutlichkeit, wie sie bisher fast nur bei der *Entamoeba tetragena* (Hartmann 1908) bekannt sind. In einigen Präparaten beobachteten wir auch mehrmals enorm aufgeblähte Kerne, die uns aber ihrem ganzen Aussehen nach pathologisch zu sein schienen, und etwa mit den von Richard Hertwig beschriebenen Vorgängen der physiologischen Degeneration an Protistenkernen gleichzustellen sind.

Fortpflanzung. — Bei Beginn der Kernteilung findet man in der Kernsaftzone nur noch an der Kernmembran einen feinen chromatischen Belag, der aber später auch verschwindet (Taf. 7, Fig. 53). Die ganze Mitose spielt sich also wiederum nur am Caryosom ab. Dieses zeigt, wie bei den zyklischen Veränderungen, eine periphere achromatische Zone, doch enthält die ursprüngliche Caryosomgrenze kaum Spuren von Chromatin. Der ganze Kern, vor allem aber diese periphere Zone des Caryosoms, streckt sich nun in die Länge, während der zentrale Teil kompakt kugelig bleibt (Taf. 7, Fig. 53). Die Längsstreckung des peripheren Teiles setzt sich weiter fort, bis er in der Mitte nur noch die Breite des Zentralteiles aufweist, und es entsteht somit eine Spindelfigur, an der man jetzt auch an den spitzen Polen, die bisher nicht differenzierbaren Centriolen beobachtet (Taf. 7, Fig. 54 bis 56). Einmal fanden wir auch noch chromatische Körner in der sonst achromatischen Spindel (Taf. 7, Fig. 54). In der Regel ist sie aber ganz achromatisch,

co, e nas mais das vezes separado por uma especie de membrana (Est. 7, Fig. 56) da zona do suco nuclear. A parte central do cariozoma achata-se então nos pólos, transformando-se diretamente em placa equatorial (Est. 7, Fig. 55 e 56). Nas figuras ulteriores que nos foi dado examinar viam-se as placas ou cariozomas filhos que já se achavam completamente nos pólos do fuzo (Est. 7, Fig. 57).

Até esse estádio, o fuzo permanecia no eixo lonjitudinal da celula; dá-se agora, nitidamente, rotação de 90°, como mostra a Fig. 59; aprezentam-se, então, as duas placas filhas em fórma de chouriço e se prendem, apenas, por meio de delgadas pontes acromaticas, restos do fuzo primitivo; a membrana nuclear tambem quazi se acha completamente dissolvida. Segue-se, então, a divizão da zona de suco nuclear transversalmente ao longo eixo da celula (Est. 7, Fig 60). Aqui, provavelmente se enquadra a Fig. 58, que apenas vimos uma vez no inicio de nossas observações e que nos parecia á primeira vista reprezentar um fuzo com placas equatoriais e fortes calotas polares (todavia a figura com essa significação não entra absolutamente na serie de estádios por nós ulteriormente observados). Trata-se provavelmente de estádio tardio de anafaze semelhante ao da Fig. 59, onde, porém, só uma placa filha (cariozoma) sofreu a rotação de 90°, emquanto a outra se sobrepõe, transversalmente, á sua pozição primitiva. Esta superpozição dá a impressão erronea de figura de fuzo. Em apoio dessa explicação falam os fatos de que já a membrana nuclear se acha dissolvida, assim como a formação dos novos flajelos, e, a modificação da celula que precede a divizão, está tão adiantada como nos estádios correspondentes da anafaze (Comparem-se as Fig. 59 e 60).

Contrariamente ao que se dá com o *Cercomonas* e o *Spongomonas*, os antigos flajelos permanecem, aqui, em regra durante a divizão (Est. 7, Fig. 54, 56 e 58) e são aproveitados por um dos animais filhos (Est. 7, Fig. 58 a 61). Do como se

doch gegen die Kernsaftzone öfters durch eine Art Membran begrenzt (Taf. 7, Fig. 56). Der zentrale Caryosomteil plattet sich nun an den Polen ab und wird direkt zur Aequatorialplatte (Taf. 7, Fig. 55, 56). Auf dem nächsten Stadium, das uns zu Gesicht kam, waren die Tochterplatten resp. Caryosome schon ganz an den Polen der Spindel (Taf. 7, Fig. 57).

Bis zu diesem Stadium lag die Spindel stets in der Längsaxe der Zelle; es erfolgt nun eine deutliche Drehung um 90° wie Fig. 59 zeigt; hier sind die beiden Tochterplatten wurstförmig und stehen nur noch durch dünne achromatische Brücken, dem Rest der Spindel, mit einander in Verbindung, und auch die Kernmembran ist fast vollständig aufgelöst. Nun folgt quer zur Längsaxe der Zelle die Teilung der Kernsaftzone (Taf. 7, Fig. 60). Hierher gehört wohl auch das Bild der Fig. 58, das wir nur einmal zu Anfang unserer Untersuchung beobachtet haben und zunächst für eine Spindelfigur mit Aequatorialplatte und starkem Polkappen hielten; doch passt das Bild in dieser Deutung absolut nicht in die Reihe der später von uns beobachteten Stadien. Wahrscheinlich handelt es sich um ein spätes Stadium der Anaphase, ähnlich dem der Fig. 59, wobei aber die eine Tochterplatte (Caryosom) die Drehung um 90° allein ausgeführt hat, während die andere noch in ihrer ursprünglichen Lage quer darüberliegt. Diese Ueberlagerung täuscht dann eine Spindelfigur vor. Für diese Deutung spricht auch der Umstand, dass die Kernmembran schon ganz gelöst ist, auch die Anlage der neuen Geisseln und die Umwandlung der Zelle zur Teilung schon soweit vorgeschritten sind, wie auf den entsprechenden Stadien der Anaphase (Vergleiche Fig. 59 u. 60).

Im Gegensatz zu *Cercomonas* und *Spongomonas* bleiben hier bei der Teilung die alten Geisseln in der Regel erhalten (Taf. 7, Fig. 54, 56, 58), und werden von dem einen Tochtertier übernommen (Fig. 58 bis 61). Wie jedoch die Bildung der neuen Geisseln mit ihrem Diplosom und Rhizoplast zustandekommt, konnten wir nicht

formam os novos flajelos com os respetivos diplozoma e rizoplasto, não podemos referir, com segurança. Segundo a Fig. 61 poderia parecer que, como acontece no *Cercomonas* e *Spongomonas*, o aparelho flajelar se formára de novo á custa d'um nucleo. Outros aspetos (Est. 7, Fig. 58 a 60) mostram, porem, que já nas ana- e telofazes se vêm os novos diplozomas e flajelos, sem a prezença do rizoplasto. Deve-se prezumir aqui que o novo diplozoma se orijinou do antigo, por divizão, e que a inserção flajelar tipica se dá, aqui, de modo inteiramente oposto, no sentido de que sái do diplozoma (por divizão) uma fibrila — o rizoplasto — que crece até penetrar no nucleo. O aspeto acima descrito da Fig. 61 (á direita) enquadrar-se-ia melhor nesta interpretação, porque, aí, o diplozoma não se acha ligado diretamente ao cariozoma, mas do rizoplasto a um corpusculo colocado ao lado delle ao passo que no nucleo filho da esquerda da figura se vê este granulo já unido ao cariozoma. Tal processo não deixa de ter analogo, porquanto na espermatojéneze de varios animais, da *Helix pomatia* (von Korff), p. ex., fato analogo é observado.

Prepara-se a divizão da celula, alongando-se ella do lado obtuzo e aprezenta então, aspeto analogo ao do lado mais longo onde se encontram os flajelos (Est. 7, Fig. 58 a 60). Simultaneamente se torna o animal mais largo, estrangulando-se depois ao nivel da parte media do seu comprimento, do modo já descrito e figurado por Buetschli.

Classificação. — Buetschli colocou este flajelado na familia das *Cryptomonadinae*, por cauza de sua estrutura celular e sobretudo da semelhança que existe entre seu aparelho farínjeo e o do *Chilomonas paramaecium*. Senn reconheceu essas relações, mas colocou a fórma em questão entre as *Amphimonadaceæ*, por cauza da alimentação animal e pela auzencia de amido, como produto do metabolismo organico. Ainda que julgando esta razão pouco válida, não obstante, concordamos com a classificação de Senn, porquanto, como mostrá-

sicher ermitteln. Nach Fig. 61 könnte es scheinen, als ob von einem Kern aus in ähnlicher Weise, wie bei *Cercomonas* und *Spongomonas* der Geisselapparat neu gebildet würde. Die anderen Bilder (Fig. 58 bis 60) zeigen aber, dass schon in den Ana- und Telophasen das neue Diplosom und die neuen Geisseln vorhanden sind und zwar ohne Rhizoplast. Hier muss man annehmen, dass das Diplosom durch Teilung des alten entstanden ist und dass die typische Geisselinsertion dann gerade umgekehrt zu Stande kommt, indem von dem Diplosom aus (durch Teilung) eine Fibrille, der Rhizoplast, in den Kern hineinwüchse. Das obenangeführte Bild der Figur 61 (rechts) würde noch besser zu dieser Deutung passen, da hierbei das Diplosom nicht mit dem Caryosom, sondern zunächst mit einem neben ihm gelegenen Korn durch den Rhizoplast in Verbindung steht, während bei dem linken Tochterkern dieses Korn schon mit dem Caryosom vereinigt ist. Ein solcher Vorgang wäre nicht ohne Analogie, da bei der Spermatogenese mancher Tiere, z. B. bei *Helix pomatia* (von Korff) Aehnliches beobachtet wurde.

Die Zellteilung wird dadurch vorbereitet, dass an der abgestutzten Seite sich die Zelle verlängert und eine ähnliche Ausbildung erfährt, wie die ursprünglich längere Geisselseite (Taf. 7, Fig. 58 bis 60). Gleichzeitig wird das Tier noch breiter und schnürt sich dann in der Mitte der Länge nach durch, wie das auch schon Bütschli geschildert und abgebildet hat.

Systematische Stellung. — Bütschli hatte dieses Flagellat zur Familie der *Cryptomonadinen* gestellt in Folge seines Zellbaues, besonders der Aehnlichkeit des Schlundapparates mit dem von *Chilomonas paramaecium*. Senn erkennt zwar diese Beziehungen an, bringt die Form aber, wegen der tierischen Ernährung und des Fehlens von Stärke als Stoffwechselprodukt bei den *Amphimonadaceen* unter. Wenn wir auch diesen Grund von Senn nicht für stichhaltig halten, so stimmen wir seiner Einreihung doch zu, denn

mos, a *Cyathomonas truncata* corresponde completamente, no que respeita á estructura do nucleo e do aparelho flajelar, ás demais *Protomonadinae*, ao passo que, nesse particular, as *Cryptomonadinae* e especialmente o *Chilomonas* aperecem muito diferentes, como já o demonstraram as pesquizas de v. Prowazek e como nós adiante veremos.

II. BINUCLEATA:

Prowazekia cruzi n. g., n. sp.

Como dissemos, este flajelado apareceu em placa de agar, onde o Dr. Faria cultivára material proveniente de fezes humanas. Nem por isso, trata-se de especie parazitaria, é fórma de vida livre, como o são varias amebas, cultivadas das fezes (V. Naegler, 1909). Isto é provado pelo fato de que o Dr. Berliner, no Instituto de Molestias infetuozas de Berlin, cultivou a mesma fórma, de agua doce. Parece-nos ella identica á especie de *Bodo spec.* figurada por v. Prowazek em trabalho sobre flajelados e de que assim descreveu a notavel inserção do flajelo:

« Ambos os flajelos nacem do mesmo espessamento, em fórma de granulo bazal que se acha colocado terminalmente em uma formação (saco do flajelo) sem estrutura, homojenia, em forma de frasco. O flajelo é independente do nucleo e, assim, alcança maior independencia ».

Como ficará provado no fim deste trabalho torna-se necessario criar novo genero bazeado nesse modo de inserção flajelar e que, em homenajem a nosso amigo von Prowazek, que descobriu esse fato, denominaremos *Prowazekia*.

Forma. — O flajelado é ovalar ou piriforme; ás vezes, as duas extremidades são adelgaçadas. As dimensões são de cerca de 8—12 μ de comprimento e 4 a 6 μ de largura. A superficie é limitada por periplasto manifestamente forte, e por isso a fórma é relativamente fixa e inalteravel.

Plasma. — O plasma é de estrutura alveolar e atravessado de grandes vacuolos que, em parte, são vacuolos nutritivos mos-

Cyathomonas truncata stimmt, wie wir gezeigt haben, im Bau vom Kern- und Geisselapparat vollkommen mit den übrigen *Protomonadinen* überein, während die *Cryptomonadinen* speziell *Chilomonas* sich in dieser Beziehung sehr verschieden erweist, wie schon die Untersuchungen von v. Prowazek gezeigt haben und wir weiter unten eingehender sehen werden.

II. BINUCLEATA:

Prowazekia cruzi n. g., n. sp.

Das Flagellat trat, wie schon erwähnt, auf einer Agar-Platte auf, die Herr Dr. Faria mit Material von menschlichen Fäces beschickt hatte. Trotzdem handelt es sich nicht um eine parasitische, sondern wie bei den verschiedenen aus Fäces gezüchteten Amoeben, um eine freilebende Form (vergl. Naegler 1909). Mit Sicherheit geht es daraus hervor, dass Herr Dr. Berliner im Institut für Infektionskrankheiten in Berlin die gleiche Form aus Süsswasser gezüchtet hat. Sie scheint uns identisch mit dem *Bodo* spec, den v. Prowazek in seiner Flagellatenarbeit abgebildet und seine merkwürdige Geisselinsertion beschrieben hat: « Beide Geisseln entspringen von einer gemeinsamen basalkornartigen Verdichtung, die terminal einem anscheinend strukturlosen homogenen phiolenartigen Gebilde (Geisselsäckchen) ansitzt. Die Geissel ist vom Kerne unabhängig und gewinnt so eine grössere Selbständigkeit ». Wie zum Schlusse näher begründet werden soll, ist auf Grund dieser Geisselinsertion die Aufstellung einer neuen Gattung notwendig, die wir zu Ehren unseres Freundes von Prowazek, des Entdeckers dieser Verhältnisse, « *Prowazekia* » nennen wollen.

Gestalt. — Das Flagellat hat eine ovale oder birnförmige Gestalt, zuweilen sind auch beide Enden verjüngt. Seine Grösse beträgt circa 8—12 μ Länge und 5—6 μ Breite. Die Oberfläche ist von einem offenbar festen Periplast begrenzt, denn die Form ist ziemlich starr und unveränderlich.

trando, varios restos alimentares. Não se verificou o modo de apreensão dos alimentos, e tão pouco a existencia de vacuolos contrateis.

Flajelos. — Ambos os flajelos têm a dispozição tipica carateristica das « *Bodonaceæ* ; o mais curto é dirijido para diante e o mais longo para traz funcionando como flajelo caudal (*Schleppgeissel*).

Elles nacem nas cercanias da extremidade anterior, ás vezes um pouco lateralmente, de 2 corpusculos bazais (diplozoma) que, na maioria das vezes, se acham tão juntos que parecem constituir um só elemento (Est. 8, Fig. 62). Poude-se, porém, verificar nitidamente que se tratavam realmente de duas granulações bem distintas (Est. 8, Fig. 63 e 64). O diplozoma parece aderente á extremidade do blefaroplasto dos autores (*Geisselsäckchen* de v. Prowazek) (Fig. 66). Nos preparados bem diferenciados, vê-se que elle se acha ligado áquelle por meio de curta fibrila (rizoplasto) (Est. 8, Fig. 62 e 69 á esquerda) ou, então, existe pequeno espaço, devido á reabsorção do rizoplasto (Est. 8, Fig. 68). Em ambos os cazos acha-se elle colocado no limite da zona clara que envolve o blefaroplasto ou antes o cariozoma do nucleo flajelar e que corresponde á sua zona de suco nuclear (Est. 8, Fig. 62—64, 66—69).

Assim, pode-se dizer que faz parte do aparelho locomotor de flajelos um nucleo completo (nucleo flajelar, blefaroplasto). Essa estrutura complicada do aparelho locomotor só é patente em um dos outros grupos de flajelados parazitos, os tripanozômos e seus afins.

Nucleo. — A *Prowazekia* se distingue de todos os flajelados de vida livre, em que possue ella dous nucleos de estrutura diferente, um dos quais corresponde ao nucleo das protomonadinas e que denominaremos *nucleo principal* e um segundo, homologo ao denominado blefaroplasto dos *binucleados* (Hartmann 1907) e mais corretamente dezignado com o nome de *cinetonucleo*, de acordo com Minchin e Woodcock.

O nucleo principal é, como nas proto-

Plasma. — Das Plasma ist wabig gebaut und von grossen Vakuolen durchsetzt, die teilweise Nahrungsvakuolen darstellen und in denen allerlei Nahrungsreste sich finden. Die Art der Nahrungsaufnahme wurde nicht beobachtet, es wurden auch keine contractilen Vacuolen festgestellt.

Geisseln. — Die beiden Geisseln haben die für die *Bodonaceen* typische Form und Anordnung ; die kürzere ist nach vorn gerichtet, die längere als Schleppgeissel nach hinten. Sie entspringen in der Nähe des Vorderendes, vielfach etwas seitlich von zwei Basalkörnern, (Diplosom), die aber meist so dicht zusammenliegen, dass sie als ein einziges erscheinen (Taf. 8, Fig. 62). Doch konnte man öfters deutlich beobachten, dass es sich um zwei ganz distinkte Körner handelt (Taf. 8, Fig. 63 und 64). Das Diplosom scheint dem sog. Blepharoplasten (Geisselsäckchen von v. Prowazek) terminal anzusitzen (Fig. 66). In gut differenzierten Präparaten sieht man jedoch, dass es durch eine kurze Fibrille (Rhizoplast) mit demselben verbunden ist (Taf. 8, Fig. 62, 69 links), oder aber es ist ein kleiner Zwischenraum vorhanden, in welch letzterem Falle der Rhizoplast eingeschmolzen ist (Fig. 68). In beiden Fällen liegt es an der Grenze eines hellen Hofes, der sich um den Blepharoplasten, richtiger Caryosom des Geisselkernes, zieht und der Kernsaftzone desselben entspricht (Fig. 62—64, 66—69). Somit gehört gewissermassen ein ganzer Kern (Geisselkern, Blepharoplast) mit zu dem Lokomotionsapparat des Flagellaten. Dieser komplizierte Bau des Lokomotionsapparates ist sonst nur bei einer Gruppe von parasitischen Flagellaten, den Trypanosomen und Verwandten verwirklicht.

Kerne : — Die *Prowazekia* zeichnet sich also von allen freilebenden Flagellaten dadurch aus, dass sie zwei verschieden differenzierte Kerne besitzt, einen, der dem Kern der Protomonadinen entspricht, welchen wir *Hauptkern* nennen wollen und einen zweiten, der dem sogenannten *Blepharoplasten* der *Binucleaten* (Hartmann

monadinas primitivas e tambem nos tripanozômos, veziculozo, com grande cariozoma (Est. 8, Fig. 62 a 65). A membrana nuclear nem sempre é muito nitida, mas existe. Na zona de suco nuclear, encontra-se pouca cromatina, o que acontece tambem nos tripanozômos, como o demonstraram as recentes pesquizas de Moore e Breinl, Rosenbusch e Chagas. O cariozoma é muito compacto, pelo que, habitualmente, não se pode dicernir o centriolo nelle incluido. Somente, logo apoz a divizão, quando elle está ainda bastante intumecido é que poude ser apercebido (Est. 8, Fig. 76).

Que na realidade aqui o *nucleo flajelar* ou o *cinetonucleo* é um nucleo completo, sobresae já em que, quando os flajelos e corpusculo bazal se acham mal córados (p. ex. nos cistos) a diferenciação delle com o nucleo principal é apenas possivel, (Est. 8, Fig. 62 e 78). A diferença principal é que sua zona de suco nuclear as mais das vezes é muito estreita, ao passo, que o cariozoma, que até agora nos tripanôzomos tinha sido considerado unicamente, como blefaroplasto (vide sobre este assunto Rosenbusch e Chagas) dezenvolve-se enormemente e não raro é maior que o nucleo principal. E' raro que aprezente fórma esferica, habitualmente é alongado, oval, (Est. 8, Fig. 63), piriforme ou em fórma de frasco (*phiolenartig* de v. Prowazek) (Fig. 66). Assim a estrutura do nucleo flajelar é identica á descrita nos tripanozômos por Chagas e Rosenbusch. Tamanho e fórma do cariozoma especialmente lembram de maneira surpreendente o nucleo flajelar dos tripanoplasmas (Laveran e Mesnil, Keysselitz, Minchin).

Multiplicação. — Por ocazião da divizão binaria, ora o nucleo flajelar se divide antes do nucleo principal, ora é o inverso que se observa. A divizão do nucleo principal se efetúa inteiramente no cariozoma, e assim as figuras de divizão ficam aqui envolvidas pela zona de suco nuclear inteiramente sem estrutura. O estado mais primordial que nos foi dado observar (Est. 8, Fig. 66), muito se assemelha ao da *Cyatho-*

1907) homolog ist und der am besten mit Minchin und Woodcock als *Kinetonucleus* bezeichnet wird.

Der *Hauptkern* ist, wie bei einfachen Protomonadinen und auch bei Trypanosomen, bläschenförmig mit grossem Caryosom (Fig. 62 bis 65). Die Kernmembran ist manchmal nicht sehr deutlich, aber vorhanden. In der Kernsaftzone findet sich wenig Chromatin, was nach den neuen Untersuchungen von Moore und Breinl, Rosenbusch und Chagas ja auch für die Trypanosomen zutrifft. Das Caryosom ist sehr kompakt, weswegen auch das in ihm eingeschlossene Centriol gewöhnlich nicht zu sehen ist. Nur kurz nach der Teilung, wo es ziemlich aufgebläht ist, konnte letzteres wahrgenommen werden (Fig. 76).

Dass der *Geissel*kern oder *Kinetonucleus* hier in der Tat ein vollständiger Kern ist, leuchtet schon daraus ein, dass wenn Geisseln und Basalkörner schlecht gefärbt sind (z. B. in Cysten), er kaum vom Hauptkerne zu unterscheiden ist (Taf. 8, Fig. 62 und 78). Der Hauptunterschied ist der, dass seine Kernsaftzone meist sehr schmal, sein Caryosom dagegen, das bisher bei Trypanosomen meist allein als Blepharoplast bezeichnet wurde, (vergl. hierüber Rosenbusch und Chagas) ausserordentlich stark entwickelt und oft grösser als das des Hauptkernes ist. Selten weist es kugelige Gestalt auf, meist ist es gestreckt, oval (Fig. 63) oder birnförmig resp. « phiolenartig » (Fig. 66) (von Prowazek). Der Bau des Geisselkernes ist mithin der gleiche, wie ihn Rosenbusch und Chagas bei Trypanosomen beschrieben haben. Die Grösse und Form seines Caryosoms erinnert speziell ganz auffallend an den Geisselkern von *Trypanoplasma* (Laveran u. Mesnil, Keysselitz, Minchin).

Fortpflanzung. — Bei der Zweiteilung geht teils die Teilung des Geisselkernes der des Hauptkernes voran, teils umgekehrt. Die Teilung des Hauptkernes spielt sich ganz am Caryosom ab und die Kernteilungsfiguren sind hierbei von der ganz strukturlosen Kernsaftzone umgeben.

monas truncata: vê-se um largo fuzo acromatico em fórma de barril em cada pólo do qual se notam duas granulações unidas por filamento que, segundo nosso ponto de vista, não são mais que os centriolos em divizão.

Ao nivel do equador existe larga massa transversal de cromatina, a placa equatorial. Em estádios mais adiantados o fuzo se alonga, deixando os centriolos de ser viziveis (Est. 8, Fig. 67). E' notavel que nesse estádio a placa equatorial é constituida de duas grandes esféras de cromatina (Est. 8, Fig. 67), que, como no *Ascaris* podem ser consideradas como cromozomios coletivos (*Sammelchromosomen*) ou talvez, como indicio de estádio gonomeral (Haecker) i. é, como elementos nucleares diversos de orijem,ora paterna,ora materna. Cada um destes dois elementos de cromatina da placa equatorial se torna em seguida mais largo e toma finalmente a fórma de biscoito (Est. 8, Fig. 68), separando-se depois por estrangulamento (Est. 8, Fig. 69) de modo que se formam duas placas filhas nas quais os elementos de cromatina costumam fundir-se outra vez. Segue-se, então, rapidamente o estrangulamento em halteres do fuzo (Est. 8, Fig. 70 e 71). Os dous nucleos filhos, novos e em via de reconstituição, permanecem por longo tempo constituidos de dous elementos separados: uma massa geralmente acromatica orijinaria do fuzo e outra porção mais cromatica que provem das placas filhas (Est. 8, Fig. 71). Nestas ultimas na Fig. 77 os dous elementos de cromatina ainda se acham separados. A parte acromatica, já nos estádios anteriores (fórma em halteres. Fig. 70) póde encerrar substancia cromatica, habitualmente, porém, isto se dá um pouco mais tarde, pouco antes que elle creça circundando o outro (Est. 8, Fig. 74 e 75) e com elle se una com o que se fórma de novo o cariozoma normal (Est. 8, Fig. 76).

Além destes, observam-se dous outros aspetos que indicam segunda modalidade mais abreviada de divizão nuclear. O cariozoma alonga-se lijeiramente de modo que o nucleo exterior conserva ainda a fórma es-

Das früheste Stadium (Fig. 66), das wir fanden, gleicht sehr dem von *Cyathomonas truncata*: wir sehen eine breite, tonnenförmige, achromatische Spindel, an deren Polen je zwei durch einen Faden verbundene Körner, unserer Meinung nach die im Teilungszustande befindlichen Centriolen, sich befinden. Am Aequator liegt quer eine breite Chromatinmasse, die Aequatorialplatte. Bei den späteren Stadien streckt sich die Spindel in die Länge, wobei die Centriolen nicht mehr gesehen wurden (Taf. 8, Fig. 67). Auffallend ist, dass in diesem Stadium die Aequatorialplatte aus zwei grossen Chromatinkugeln besteht (Taf. 8, Fig. 67), die, wie bei *Ascaris*, als Sammelchromosomen betrachtet werden können, vielleicht aber auch als Zeichen eines gonomeren Zustandes (Haecker), d. h. als gesonderte, väterliche und mütterliche Kernbestandteile anzusprechen sind. Jedes dieser beiden Chromatinelemente der Aequatorialplatte wird nun breiter, schliesslich biscuitförmig (Taf. 8, Fig. 68) und schnürt sich dann durch (Taf. 8, Fig. 69), sodass zwei Tochterplatten entstehen, bei denen die Chromatinelemente meist wieder verschmelzen. Nun folgt sehr rasch die hantelförmige Durchschnürung der Spindel (Taf. 8, Fig. 70 u. 71). Die in Rekonstruktion begriffenen neuen Tochterkerne bestehen lange Zeit noch aus zwei getrennten Elementen, einer meist achromatischen Kugel, die aus der Spindel hevorgegangen ist und einem mehr chromatischen Teil, der von der Tochterplatte stammt (Taf. 8, Fig. 71); in letzterem sind in Fig. 77 auch noch die zwei Chromatinelemente getrennt. Der achromatische Teil kann schon in früheren Stadien (Hantelstadien Fig. 70) chromatische Substanz enthalten, gewöhnlich aber tritt dies erst später ein kurz bevor er den anderen umwächst (Fig. 74 u. 75), und sich mit ihm vereinigt, wodurch nun dann wieder das normale Caryosom entsteht (Fig. 76).

Ausserdem wurden noch zwei Bilder beobachtet, die auf einen zweiten, abgekürzten Modus der Kernteilung hinweisen; dabei streckt sich das Caryosom nur wenig

ferica e nelle se processa então uma diferenciação em parte cromatica e acromatica. A primeira destas divide-se rapidamente (Est. 8, Fig. 72) e as porções rezultantes dessa divizão dirijem-se rapidamente para os pólos, ficando apenas ligadas por delgada fibrila, a centrodesmoze (Est. 8, Fig. 73); a porção acromatica, ao contrario do processo habitual permanece entre as duas massas de cromatina. Não dispomos de observação alguma que nos autorize a decidir se esse segundo modo de divizão nuclear é relacionado a estádios especiais de dezenvolvimento. Como tambem nas amebas se observam muitas vezes dous modos diversos de divizão nuclear [Vahlkampf (1905), Naegler (1906), Aragão (1909)], do qual um é evidentemente modalidade mais simples e mais rapida do outro, tambem neste cazo será talvez essa a unica explicação.

Pouco podemos dizer sobre a divizão do nucleo flajelar, visto a rapidez com que se processa. Poucas figuras, que a ella se relacionariam, cairam sob nossa observação. Numa dellas, que mais vezes se nos deparou, o cariozoma aprezenta-se fuziforme, mais palido no interior e de coloração mais escura nas bórdas; a estreita zona de suco nuclear só é vizivel do lado virado para a celula. O antigo corpusculo bazal adere a um dos pólos e no outro percebe-se um fino prolongamento semelhante a um granulo (centriolo?) (Est. 8, Fig. 76). No cazo figurado provavelmente a divizão do nucleo principal por acazo já está terminada. Vimos, ao contrario, apenas uma vez o aspeto reprezentado pela figura 65, onde, no lugar de nucleo flajelar se vê um pequeno fuzo com placa equatorial. Tal aspeto lembra as figuras de divizão que Rosenbusch deu do nucleo blefaroplastico dos tripanozômos. Como mostra a figura 64 a divizão do cariozoma do nucleo flajelar se póde efetuar muito rapidamente (abreviada, aparentemente amitozica). Apoz o estrangulamento permanece muitas vezes por mais tempo a centrodesmoze, assim é que á Fig. 71 se vê resto da mesma prezo ao novo nucleo flajelar da esquerda.

in die Länge — auch der Aussenkern behält seine kugelige Form — und es tritt an ihm eine Differenzierung in eine chromatische und achromatische Partie auf. Erstere teilt sich rasch (Taf. 8, Fig. 72), wobei die Teilhäften sofort an die Pole rücken und nur noch durch eine feine Fibrille, Centrodesmose, verbunden sind (Taf. 8, Fig. 73), während der achromatische Teil im Gegensatz zu dem gewöhnlichen Modus zwischen den Chromatinkugeln liegt. Es stehen uns keine Beobachtungen zur Verfügung, die entscheiden lassen, ob dieser zweite Modus mit besonderen Entwicklungszuständen in Zusammenhang steht. Da auch bei Amoeben öfters zwei verschiedene Kernteilungsmodi beobachtet wurden [Vahlkampf (1905), Naegler (1909), Aragão (1909)], von denen der eine offenbar nur als eine einfachere, rascher verlaufende Variation des andern zu betrachten ist, wird wohl auch hier das der einzige Grund sein.

Ueber die Teilung des Geisselkernes können wir weniger berichten, da sie sich offenbar sehr rasch vollzieht. Es kamen uns nur wenige Bilder zu Gesicht, die sich darauf beziehen lassen. Bei dem einen, das häufiger beobachtet wurde, hat das Caryosom eine spindelförmige Gestalt und ist im Innern blasser, am Rande dunkler gefärbt; die schmale Kernsaftzone ist nur an der, der Zelle zugekehrten, Seite deutlich. An dem einen Pole sitzt das alte Basalkorn an, und am anderen sieht man einen leichten feinen körnchenartigen Fortsatz (Centriol?) (Taf. 8, Fig. 76). In dem abgebildeten Falle ist zufällig die Teilung des Hauptkernes schon beendet. Nur einmal haben wir dagegen das in Fig. 65 dargesttelte Bild beobachtet, wo an Stelle des Geisselkernes eine kleine Spindel mit Aequatorialplatte sich findet. Das Bild erinnert an die Teilungsfiguren, die Rosenbusch vom Blepharoplastkern von Trypanosomen gegeben hat. Wie Figur 64 zeigt, kann auch beim Geisselkern die Caryosomteilung sehr rasch (abgekürzt, scheinbar amitotisch) sich vollziehen. Bei der Durchschnürung bleibt häufig die Centrodesmose länger erhalten;

Os antigos flajelos permanecem em relação a uma das metades filhas do cinetonucleo e serão conservados por um dos animais filhos, ao passo que do outro flajelo formar-se-ão dous novos; nessa ocazião, por divizão heteropolar do seu cariozoma formar-se-á novo corpusculo bazal (Est. 8, Fig. 69, á esquerda).

A celula divide-se por divizão lonjitudinal tipica, em consequencia da qual é ella estrangulada de diante para traz (Est. 8, Fig. 77).

Consignemos ainda aqui a existencia de figuras que vimos em alguns preparados e que se relacionam talvez á divizão multipla (esquizogonia). Tratam-se de celulas de *Prowazekia* que encerram grande numero de figuras semelhantes a nucleos (Est. 8, Fig. 82). Como não tenhamos podido observar o dezenvolvimento dessa fórma, esta explicação não é certa; é mesmo possivel que se trate de incluzões parazitarias como já tem sido bastas vezes observado nas amebas (Dangeard, Doflein, Naegler). Em favor da primeira hipoteze fala o fato de que muita vez encontrámos nas culturas individuos extremamente pequenos que bem se poderiam ter orijinado de tal esquizogonia.

Cistos. — Apoz algum tempo o flajelado encista-se nas placas de agar. Estes cistos, como nos *Cercomonas*, são simples cistos de rezistencia, e, assim mesmo, em regra, os flajelos são conservados. Os animais, em parte com a fórma oval, em parte com a fórma esferica somente se cercam de fina membrana.

Nos preparados bem córados vê-se claramente no interior dos cistos os flajelos (Est. 8, Fig. 78 a 81). Encontrámos por varias vezes cistos com dous nucleos principais e dous nucleos flajelares o que provavelmente corresponde a imediata divizão lonjitudinal, logo apoz o encistamento (Est. 8, Fig. 80). Este processo evidentemente nada tem que ver com a autogamia. No estado vivo, sobretudo nas fórmas alongadas de cistos, póde-se observar muito bem o esso sieht man in Fig 71 noch einen Rest derselben in Verbindung mit dem linken neuen Geisselkern.

Die alten Geisseln bleiben mit der einen Tochterhälfte des Kinetonucleus in Verbindung und werden von dem einen Tochtertier übernommen, während von dem anderen aus ein neues Paar gebildet wird; hierbei entsteht zunächst durch heteropole Teilung seines Caryosoms ein neues Basalkorn (Fig. 69 links).

Die Zellteilung ist eine typische Längsteilung, wobei die Zelle von vorn nach hinten durchschnürt wird (Taf. 8, Fig. 77). An dieser Stelle sei noch auf Bilder hingewiesen, die wir in einigen Präparaten antrafen und die eventuell mit einer multiplen Teilung (Schizogonie) in Beziehung stehen. Es handelt sich um Zellen von *Prowazekia*, die eine grössere Anzahl kernartiger Gebilde enthalten (Fig. 82). Da wir die Entwicklung dieser Formen nicht beobachtet haben, scheint uns die Deutung nicht ganz sicher und es wäre auch möglich, dass es sich um parasitäre Einschlüsse handelt, wie sie ja speziell bei Amoeben häufig beobachtet werden (Dangeard, Doflein, Naegler). Für die erste Deutung lässt sich einführen, dass wir öfters in den Kulturen äusserst kleine Individuen antrafen, die sehr wohl aus einer derartigen Schizogonie hervorgegangen sein können.

Cysten. — Nach einiger Zeit encystiert sich das Flagellat auf der Agarplatte. Die Cysten sind wie bei *Cercomonas* einfache Dauercysten, doch bleiben dabei die Geisseln in der Regel erhalten. Die Tiere umgeben sich einfach, teils im ovalen, teils im abgekugelten Zustande, mit einer feinen Membran. Im Innern der Cysten sieht man in gut gefärbten Präparaten deutlich die Geisseln (Fig. 78-81). Wir trafen mehrmals Cysten mit zwei Haupt- und zwei Geisselkernen, was wohl mit einer sofortigen Längsteilung nach der Encystierung zusammen hängt (Taf. 8, Fig. 80). Mit Autogamie hat der Vorgang offenbar nichts zu tun. Sehr schön kann man im Leben besonders bei den lang gestreckten Cysten das Ausschlüpfen des Flagellaten

capamento do flajelado. Elle gira ativamente no interior do cisto até que se forme rutura numa das extremidades pela qual se escapa. A membrana cistica permanece sob a forma de envólucro muito delgado dificilmente vizivel.

Classificação. — Da descrição acima dada do nucleo e do aparelho flajelar sobresae nitidamente que nosso flajelado se diferencia de modo sorprendente das demais protomonadinas. No começo, v. Prowazek o considerou como especie de *Bodo*, mas nessa epoca não era conhecida a citolojia das *Bodonaceae*. Mais tarde, o proprio v. Prowazek descreveu para o parazito *Bodo lacertae* inserção flajelar que corresponde á das outras protomonadinas. Podemos dizer o mesmo para um *Bodo* de vida livre que reprezentamos na figura junto:

beobachten. Es rotiert lebhaft innerhalb desselben bis sich an einem Ende ein Riss bildet, durch den es entschlüpft. Die Cystenmembran bleibt als eine sehr feine, schwer sichtbare Hülle zurück.

Systematische Stellung. — Aus der oben gegebenen Beschreibung des Kern- und Geisselapparates geht ohne Weiteres hervor, dass unser Flagellat sich von den übrigen Protomonadinen auffallend unterscheidet. V. Prowazek hat es zwar anfangs für eine *Bodo*-Art gehalten, doch war damals von keiner *Bodonacee* die Cytologie bekannt. Später hat aber v. Prowazek selbst für den parasitischen *Bodo lacertae* eine Geisselinsertion beschrieben, die mit der der übrigen Protomonadinen übereinstimmt. Das gleiche können wir für eine freilebende *Bodo*-Art angeben, von der wir in der Textfigur eine Abbildung geben:

Encontra-se aqui apenas um nucleo, cujo cariozoma se acha ligado por meio de rizoplasto com as granulações bazais das quais nacem os flajelos. Como rezulta de tudo isto, nossa forma não póde ser incluida no genero *Bodo* e necessaria se torna a creação de novo genero a que, como foi dito no começo, denominámos *Prowazekia*.

O genero *Prowazekia* mostra, no que respeita ao nucleo e flajelos admiraveis concordancias com os tripanozômidas, especialmente com o genero *Trypanoplasma*, o que já tinha sido assinalado por v. Prowazek.

Esta ultima especie só se distingue daquella em que no tripanoplasma o flajelo caudal está unido ao corpo, formando membrana ondulante. Já anteriormente Hartmann (1907), bazeando-se no complicado aparelho locomotor dos tripanozômidas e seus afins os separára das demais protomonadinas, levando-os, assim como os

Hier findet sich nur ein Kern, dessem Caryosom durch den Rhizoplasten mit den Basalkörnern, von denen die Geisseln entspringen, verbunden ist. Wie hieraus ersichtlich, kann daher unsere Form nicht zur Gattung *Bodo* gestellt werden und es ist die Errichtung einer neuen Gattung nötig, die wir, wie eingangs erwähnt, *Prowazekia* nennen.

Die Gattung *Prowazekia* zeigt nun in den Kern- und Geisselverhältnissen eine auffallende Uebereinstimmung mit den Trypanosomen, speziell mit der Gattung *Trypanoplasma*, worauf v. Prowazek schon hingewiesen hat. Letztere unterscheidet sich von ihr nur dadurch, dass die Schleppgeissel durch Verklebung mit dem Körper zur undulierenden Membran geworden ist. Die Trypanosomiden und ihre Verwandten hat nun Hartmann (1907) schon früher auf Grund ihres komplizierten lokomotorischen Apparates von den Protomonadinen ge-

demais protozoarios do sangue denominados hemosporidios para nova ordem de flajelados, que denominou *Binucleata*, por cauza da sua particularidade mais distinta, a duplicidade nuclear reprezentada pelo nucleo principal e pelo flajelar. Pelo que se acaba de ver o genero *Prowazekia* deve ser incluido entre os *Binucleata*, constituindo no genero a unica fórma não parazitaria. Segundo toda a probabilidade, do genero *Prowazekia* provem o genero *Trypanoplasma*, que não é só parazito de sangue, mas tambem do intestino. Assim, pois, colocamos o genero *Prowazekia*, ao lado do *Trypanoplasma*, na familia dos *Trypanoplasmidae*.

III. CHROMOMONADINA:

Chilomonas paramaecium Ehrbg.

De todos os flajelados a ordem das *Chromomonadina* Blochmann tem sido a menos estudada no ponto de vista citolojico. Sómente o *Chilomonas paramaecium*, pertencente á sub-ordem das *Cryptomonadina* foi estudada, no que respeita á citolojia, por v. Prowazek (1903) e por Awerinzew (1906). Estes dous autores, porém, não são concordes nas descrições que fazem. Como se aprezentaram em nossas culturas numerozos flajelados destes, aproveitámos a oportunidade para conferir os rezultados daquelles autores. Referir-nos-emos estritamente ás questões que se relacionam ao nucleo e á inserção flajelar.

Segundo v. Prowazek o nucleo é separado do plasma por membrana; ao centro vê-se o cariozoma cercado de nucleo exterior fortemente dezenvolvido que deixa ver sempre certo numero de granulos de cromatina.

Awerinzew, ao contrario, nega a existencia de membrana nuclear e só considera como nucleo o cariozoma cercado duma zona clara; o nucleo exterior é por elle considerado zona cromidial perinuclear por isso, que, segundo elle, não é separado por membrana, sendo os contornos irregularmente estrelados. Pudemos confirmar completamente as observações e interpretações de v. Prowazek. Junte-se ainda que descotrennt und zusammen mit den übrigen Blutprotozoen, den sog. Haemosporidien, zu einer neuen Flagellatenordnung erhoben, der er den Namen *Binucleata* gab, infolge ihres hervorstechendsten Merkmales, der Doppelkernigkeit (Hauptkern und Geisselkern). Wie ersichtlich muss die Gattung *Prowazekia* ebenfalls bei den Binucleaten eingereiht wurden, als die, bisher einzige, hierher gehörige, freilebende Form. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist von ihr direkt die Gattung *Trypanoplasma*, die ja nicht nur als Blutparasit, sondern auch im Darme vorkommt, abzuleiten. Wir stellen daher die Gattung *Prowazekia* zu der Gattung *Trypanoplasma* in der Familie der *Trypanoplasmiden*.

III. CHROMOMONADINA:

Chilomonas paramaecium Ehrbg.

Die Ordnung der *Chromomonadina* Blochmann ist am wenigsten von allen Flagellaten cytologisch erforscht. Nur die zur Unterordnung der Cryptomonadina gehörige *Chilomonas paramaecium* ist von v. Prowazek (1903) und Awerinzew (1906) cytologisch untersucht. Beide Autoren weichen jedoch in ihrer Beschreibung wesentlich von einander ab. Da in unseren Kulturen dieses Flagellat in grosser Menge vorkam, so haben wir die Gelegenheit benutzt, die Angaben der beiden Autoren nachzuuntersuchen. Wir werden dabei nur auf die strittigen Punkte, den Kern und die Geisselinsertion, näher eingehen.

Nach v. Prowazek ist der Kern durch eine Membran gegen das Plasma abgegrenzt; im Centrum findet sich ein Caryosom und darum ein stark entwickelter Ausserkern, der stets eine Anzahl Chromatinkörner aufweist. Awerinzew dagegen bestreitet das Vorhandensein der Kernmembran und fasst nur das von einem hellen Hof umgebene Caryosom als Kern auf, den Aussenkern aber als eine perinucleäre Chromidialzone, da sie nach ihm gegen das Plasma nicht durch eine Membran abgegrenzt, sondern unregelmässig sternförmig in ihrem Umrisse verlaufe. Wir können die Angaben und Deu-

brimos um centriolo no cariozoma (Est. 9, Fig. 90).

Como já v. Prowazek (1907) prezumira na resposta que deu a Awerinzew o aspeto diverso do nucleo (arredondado com membrana nuclear, ou com zona cromidial de aspeto estrelado) deve no ultimo cazo ser atribuida a insuficiencias de fixação, do que varias vezes nos pudemos convencer em nossos preparados. No que respeita á divizão nuclear nada mais conseguimos verificar além do que já havia sido visto por v. Prowazek e Awerinzew (Est. 9, Fig. 91). Parece que ella se processa rapidamente. E, tanto quanto se póde ajuizar dos poucos estádios observados, essa divizão lembra a que se dá no nucleo das euglenoideas e no dos dinoflajelados.

Ainda ha discordancia entre v. Prowazek e Awerinzew no que respeita á inserção dos flajelos. Segundo v. Prowazek os dous flajelos nacem dum diplozoma, do qual uma fibrila (rizoplasto) se dirije, passando ao lado do nucleo, para o corpusculo bazal situado á extremidade posterior. Para Awerinzew esta fibrila termina no nucleo (cariozoma). Isto provem de que nem sempre o corpusculo bazal se acha na extremidade posterior das celulas, mas algumas vezes ao nivel do nucleo (Est. 9, Fig. 89), e que, sendo visto do outro lado, dá a impressão de sair do cariozoma. Ao contrario, nada vimos referente á divizão do rizoplasto em 2 hastes, das quais uma iria ao nucleo e outra ao corpusculo bazal na extremidade posterior da celula o que foi citado na replica de v. Prowazek (1907).

V. EUGLENOIDEA:

Peranema trichophorum (Ehrbg.).

Depois dos trabalhos de Blochmann e Keuten, Dangeard, Steuer, v. Prowazek as euglenoideas podem ser consideradas como a ordem de flajelados mais bem estudada no ponto de vista citolojico, e sua delimitação no sistema já antes destes estudos estava bem estabelecida, devido á sua organização carateristica (Klebs). Assim mesmo aproveitámos com bastante

tungen v. Prowazeks vollauf bestätigen. Hinzugefügt sei noch der Befund eines Centriols im Caryosom (Fig. 90). Wie v. Prowazek (1907) schon in seiner Erwiderung an Awerinzew vermutet hat, ist das verschiedene Aussehen des Kerns (kuglig mit Kernmembran oder scheinbar sternförmige Chromidialzone) auf im letzteren Falle ungenügende Fixierung zurückzuführen, wie wir uns an unseren Präparaten öfters überzeugen konnten. Von der Kernteilung haben wir auch mehr gesehen als v. Prowazek und Awerinzew (Fig. 91). Sie scheint sehr rasch vor sich zu gehen. Soweit die wenigen Stadien ein Urteil zulassen, erinnert sie an die der Euglenoideen, sowie die der Dinoflagellaten.

Auch bezüglich der Geisselinsertion bestehen Differenzen zwischen v. Prowazek und Awerinzew. Nach v. Prowazek entspringen die beiden Geisseln von einem Diplosom, von dem aus eine Fibrille (Rhizoplast) an dem Kerne vorbei zu einem im Hinterende gelegenen Basalkorn verläuft. Awerinzew gibt jedoch an, dass diese Fibrille in dem Kern (Caryosom) endigt. Dies kommt daher, dass das Basalkorn häufig nicht im Hinterende der Zelle, sondern in der Höhe des Kernes liegt (Fig. 89), wodurch bei Ansicht von der anderen Seite der Eindruck erweckt wird, als ob sie vom Caryosom ausginge. Von einer Verzweigung des Rhizoplasten, wobei der eine Ast zum Kern, der andere zum Basalkorn im Hinterende der Zelle gehen soll, was v. Prowazek (1907), in seiner Entgegung erwähnt, haben wir dagegen nichts gesehen.

V. EUGLENOIDEA:

Peranema trichophorum (Ehrbg.)

Die Euglenoideen können infolge der Arbeiten von Blochmann und Keuten, Dangeard, Steuer, v. Prowazek cytologisch als die best erforschte Flagellatenordnung gelten, und ihre systematische Abgrenzung ist ohnedies schon durch ihre sonstigen charakteristischen Organisationsverhältnisse wohl fundiert (Klebs). Trotzdem haben wir die Gelegenheit, die Kern-

prazer o ensejo de estudar mais por menor em nossos preparados a divizão nuclear de uma destas fórmas, principalmente afim de indagar se não existiria tambem aqui um centriolo incluido no cariozoma (Nucleocariozoma dos autores), supozição esta que foi tambem confirmada.

A organização da *Peranema* foi bem descrita por BUETSCHLI e ultimamente por KLEBS. Juntemos-lhe apenas algumas observações sobre a inserção do flajelo e o nucleo. O flajelo, a partir da sua inserção na borda superior da boca, prolonga-se pelo interior desta até ao fundo onde termina numa granulação bazal (Est. 9, Fig. 83); ao lado desta ha outra granulação bazal, de que parte uma fibrila, semelhante a um segundo flajelo, em contato intimo com o plasma, mas alcançando apenas a abertura bucal onde termina em espessamento parecido com corpusculo bazal e não se continúa como flajelo livre. Em virtude desta organização o *Peranema* deve ser tido como flajelado biflajelado, no qual um dos flajelos atrofiou-se em parte e não como monoflajelado, segundo a opinião corrente. A inserção flajelar corresponde perfeitamente á descrita por STEUER na *Eutreptia* onde todavia, tambem, o segundo flajelo se torna livre; contúdo o proprio STEUER já notara que era um dos flajelos mais fino do que o outro. No genero *Euglena* ha apenas um flajelo, mas este, segundo WAGER se divide a partir de um espessamento em fórma de granulação bazal situado no interior da cavidade bucal, e termina no fundo desta em duas granulações. No proprio *Peranema* pode tambem parecer que o flajelo se divida, si o botão terminal, aderindo ao segundo flajelo produz esta iluzão. Por isso, julgamos que a organização da *Euglena* deve ser interpretada do mesmo modo, constituindo assim este genero forma biflajelada, mas reduzida. Coexistindo em varios grupos de euglenoideas formas uni- e biflajeladas que, pelo resto

teilung eine Euglenoidee in unseren Präparaten an einer Form genauer studieren zu können, gern benutzt, vor allem, um nachzuforschen, ob nicht auch hier im Caryosom (Nucleocentrosom der Autoren) ein Centriol eingeschlossen ist, eine Erwartung, die sich auch bestätigt hat.

Der Bau von *Peranema* ist von BÜTSCHLI und zuletzt von KLEBS gut beschrieben worden. Hier seien nur einige Bemerkungen über die Geisselinsertion und den Kern hinzugefügt. Die Geissel setzt sich von ihrer Insertionstelle am oberen Rande des Schlundes in denselben hinein fort bis zu dessen Grund, wo sie in einem Basalkorn endigt (Taf. 9, Fig. 83), neben diesem liegt aber ein zweites Basalkorn, von dem eine zweite geisselartige Fibrille ausgeht, die dem Plasma dicht anliegt, aber nur bis zu der Schlundöffnung sich erstreckt, wo sie in einer basalkornartigen Verdickung endigt und sich nicht als freie Geissel fortsetzt. Auf Grund dieser Verhältnisse ist aber die *Peranema* als ein zweigeisseliges Flagellat anzusprechen, wobei die eine Geissel zum Teil rückgebildet ist und nicht wie bisher angenommen wurde als ein eingeisseliges. Die Geisselinsertion entspricht vollkommen der, die STEUER von *Eutreptia* beschrieben hat, bei welcher Form aber auch die zweite Geissell als freie Geissel ausgebildet ist; doch hat STEUER schon angegeben, dass die eine der beiden Geisseln dünner ist als die andere. Bei der Gattung *Euglena* ist nur eine Geissel vorhanden, die aber nach WAGER von einer basalkornartigen Verdickung im Innern des Schlundes an sich spaltet und dann am Grunde desselben mit zwei Körnern endet. Aehnlich kann aber auch bei *Peranema* die eine Geissel sich scheinbar spalten, was dadurch vorgetäucht wird, dass der Endknopf der reduzierten zweiten Geissel sich der ersten anlegt. Wir glauben daher, dass auch die Verhältnisse bei *Euglena* so zu deuten sind, und somit auch diese Gattung eine reduzierte zweigeisselige Form darstellt. Da in verschiedenen Gruppen der Euglenoideen ein- und zweigeisselige Formen neben einander vor-

da sua organização, são muito convizinhas, impõe-se a supozição de que a maioria destas fórmas uniflajeladas reprezenta biflajeladas apenas reduzidas; em todo o cazo deviam ser reexaminadas a esta nova luz.

Convem ainda mencionar o orgam em fórma de bastonete, o « *Staborgan* » de KLEBS que se estende do fundo da boca para traz, terminando num vacuolo. Parecia-nos tratar-se de um tubo talvez analogo ao tubo bucal de *Entosiphon*.

O nucleo é o tipico das euglenoideas já conhecido pelas investigações de BLOCHMANN, KEUTEN, DANGEARD e STEUER. Contem um grande cariozoma (Nucleolocentrozoma) e um nucleo externo muito dezenvolvido, havendo sempre granulações de cromatina incluidas numa estrutura alveolar de linina. Nas preparações fixadas é rodeado por zona clara e sem estrutura ou por camada de plasma palido e intumecido. Fig. 83 etc.). Consideramos este aspeto como devido, apenas, ao processo de fixação; parece todavia que esta parte do protoplasma seja um pouco diferente da restante e mais sujeita a alterações. No nucleo ha tambem uma zona mais clara em roda do cariozoma, indicando neste cazo fenomenos de metabolismo do cariozoma que mostra, ás vezes, um centriolo dividido. Parece, assim, que este, tambem aqui, se acha sempre em faze de divizão.

A divizão nuclear se passa como na *Euglena*; o cariozoma se alonga, ao passo que as granulações cromaticas do nucleo exterior se dispoem em cromozomios. No cariozoma alongado uma boa diferenciação mostra distintamente os centriolos divididos e ligados por centrodesmoze (Fig. 84). O proprio cariozoma tem uma periferia com cromatina densa e o centro mais claro com estrutura alveolar (Fig. 84). Este ultimo ponto foi observado por STEUER na *Eutreptia*, comquanto menos distintamente. Parece acontecer, ás vezes, que a divizão

kommen, die ihrer ganzen sonstigen Organisation nach sehr nahe stehen, so liegt die Vermutung nahe, dass der grösste Teil dieser eingeisseligen Formen in Wirklichkeit reduzierte zweigeisselige sind; jedenfalls verdienen sie unter diesem Gesichtspunkt eine erneuete Untersuchung.

Zu erwähnen ist noch das sog. *Staborgan* (KLEBS), das vom Grunde des Schlundes sich nach hinten erstreckt und in eine Vakuole endet. Es schien uns, dass es sich um eine Röhre handelt, die vielleicht der Schlundröhre von *Entosiphon* gleich ist.

Der *Kern* ist ein typischer Euglenoideenkern, wie er schon durch die Untersuchungen von BLOCHMANN, KEUTEN, DANGEARD und STEUER bekannt ist. Er enthält ein grosses Caryosom (Nucleolocentrosom) und einen sehr stark ausgebildeten Aussenkern, in dem in den Knotenpunkten eines Lininwabenwerkers stets Chromatinkörner eingebettet liegen. Im fixierten Präparat ist um ihn eine helle strukturlose Zone oder eine blasse aufgeblähte Plasmaschicht (Fig. 83, etc.) zu beobachten. Wir halten dies für ein Kunstprodukt infolge der Fixierung, doch ist wohl das Protoplasma in dieser Partie etwas verschieden von dem übrigen und besonders leicht zerstörbar. Im Kern findet sich um das Caryosom ebenfalls eine hellere Zone, hier der Ausdruck von Stoffwechselumsätzen, die sich am Caryosom abspielen. In letzterem kann man manchmal ein geteiltes Centriol beobachten, dass also auch hier sich immer im Teilungszustand zu befinden scheint (Fig. 83).

Die Kernteilung verläuft ähnlich wie bei *Euglena*; das Caryosom streckt sich in die Länge, während die Chromatinkörner des Aussenkernes sich zu Chromosomen aneinander reihen. Im gestreckten Caryosom sieht man bei guter Differenzierung deutlich die geteilten, durch Centrodesmose verbundenen Centriole (Fig. 84). Das Caryosom selbst ist an der Peripherie dicht chromatisch, im Inneren heller und zeigt Wabenstruktur (Fig. 84). Letzteres hat STEUER, wenn auch nicht so deutlich, auch

dos centriolos se faz mais rapidamente que o alongamento do cariozoma, saindo elles pelos polos (Fig. 84). Não podemos determinar se é isso um estádio normal ou se apenas se dá acidentalmente porque só uma vez prezenciámos o fato. Inclinamo-nos á ultima opinião porque tambem os cromozomios e o nucleo exterior aprezentavam aspeto anormal.

O cariozoma, normalmente, se alonga até ao limite do nucleo, aprezentando então o aspeto da Fig. 86; continuando o alongamento toma forma de halteres e na divizão se estica em prolongamentos longos e pontudos (Fig. 87). Quanto aos cromozomios no primeiro estádio (Fig. 84) são dispostos em sentido lonjitudinal em redor do fuzo do cariozoma, formando uma placa equatorial bem acuzada. Conseguimos contar seis cromozomios. Na divizão parece haver um estrangulamento transversal, como indica a Fig. 86, na qual a divizão dos cromozomios está quazi terminada chegando as placas filhas com as extremidades dos cromozomios até aos pólos do nucleo. Logo depois se segue o estragulamento do nucleo e a transformação dos cromozomios em nucleo exterior. Pode-se, então, ver que a principio as granulações de cromatina do nucleo exterior são distintamente dispostas em seis series lonjitudinais, trez de cada lado do cariozoma ainda muito alongado (Fig. 87), observação que se poderia citar em favor da teoria da individualidade dos cromozomios. Os cariozomas filhos, a principio, ainda formam processos compridos e ponteagudos (Fig. 87), fazendo saliencia na periferia do nucleo, mais tarde, dezaparecem e o cariozoma torna-se cuneiforme (Fig. 88) e depois esferico.

Não foi possivel acompanhar minuciozamente a multiplicação dos flajelos. Os corpusculos bazais dividem-se e parece que os flajelos são distribuidos entre os animais filhos, emquanto dos novos corpusculos bazais nacem dous flajelos novos. (Fig. 86 e

bei *Eutreptia* beobachtet. Es scheint vorkommen zu können, dass die Centriole rascher sich teilen, als das Caryosom sich streckt und dann an den Polen aus ihm heraustreten (Fig. 85). Ob das ein normales Stadium ist oder nur abnormerweise vorkommt, können wir nicht bestimmt sagen, da wir dies nur einmal beobachteten. Da dabei auch die Chromosomen resp. der Aussenkern ein ganz anormales Aussehen gewähren, neigen wir uns der letzteren Ansicht zu.

Das Caryosom streckt sich normalerweise bis zur Kerngrenze und weist dann die in Fig. 86 abgebildete Form auf; bei noch weiterer Streckung wird es immer mehr hantelförmig und zieht sich bei der Teilung in lange, spitze Fortsätze aus (Fig. 87). Wenden wir uns nun den Chromosomen zu. Im ersten Stadium (Fig. 84) liegen sie in Längsrichtung um die Caryosomspindel und bilden so eine deutliche Aequatorialplatte. Wir konnten dabei sechs Chromosomen zählen. Bei der Teilung scheinen sie sich der Quere nach zu durchschnüren, worauf Fig. 86 hinweist, in der die Chromosomenteilung fast beendet ist und die beiden Tochterplatten mit den Enden ihrer Chromosomen bis zu den Kernpolen reichen. Kurz darauf folgt die Durchschnürung des Kernes und die Chromosomen wandeln sich nun in den Aussenkern um. Dabei kann man sehen, dass die Chromatinkörner des Aussenkernes anfangs noch deutlich zu sechs Längsreihen, drei auf jeder Seite der noch lang gestreckten Caryosome angeordnet sind (Fig. 87), eine Beobachtung, die man zu Gunsten der Individualitätstheorie der Chromosomen einführen kann. Die Tochtercaryosome sind zunächst noch in lange, spitze Fortsätze ausgezogen (Fig. 87), die über die Kerngrenze hinausragen; später bilden sich letztere zurück und das Caryosom wird keilförmig (Fig. 88), dann kugelig.

Die Einzelheiten bei der Vermehrung der Geisseln konnten wir nicht genau feststellen. Die Basalkörner teilen sich und die alten Geisseln scheinen auf die beiden Tochtertiere verteilt zu werden, während

87). Em cada formação nova os corpusculos bazais são as mais das vezes ligados entre si. A multiplicação do orgam em bastonete realiza-se pela formação de um novo orgam ao lado do velho, entrando o primeiro na segunda metade. O modo da divizão celular se vê nas Fig. 87 e 88.

PARTE GERAL.

I. NUCLEO E APARELHO FLAJELAR DOS FLAJELADOS.

As verificações acima referidas em varios pontos reclamam a expozição das nossas ideias sobre alguns problemas gerais da citolojia dos protozoarios, principalmente no que se refere á duplicidade dos nucleos e as questões aliadas, dos centriolos, da formação dos flajelos, etc., tão discutidas nos ultimos tempos. Neste trabalho tencionamos discutir separadamente algumas destas questões, completamente, alargando, e, onde fôr precizo, reformando as nossas ideias como foram manifestadas, principalmente, no trabalho feito em colaboração por HARTMANN e v. PROWAZEK (1907).

1. Centriolo.

Nossas pesquizas provaram que em todos os flajelados bem estudados se consegue verificar um centriolo no interior do cariozoma. Foram SCHAUDINN e v. PROWAZEK que, uzando apenas o metodo de GIEMSA demonstraram pela primeira vez em 1904 a existencia de um centriolo no cariozoma dos flajelados. Mais tarde, HARTMANN observou na *Entamoeba tetragena* e as amebas do tipo *limax* um centriolo e o seu comportamento na divizão nuclear (HARTMANN e v. PROWAZEK 1907, HARTMANN 1908), verificação que NAEGLER, dicipulo de HARTMANN, conseguiu estender a grande numero de outras amebas. O fato foi confirmado por varios outros autores em mais algumas especies, de modo que a opinião manifestada no tra-

von den neu gebildeten Basalkörnern zwei neue Geisseln ihren Ursprung nehmen (Fig. 86 und 87). Die beiden Basalkörner jeder neuen Anlage sind meist durch eine Brücke verbunden. Die Vermehrung des Staborganes geschieht in der Weise, dass neben dem alten ein neues entsteht, das dann in die andere Hälfte hinüberrückt. Die Art der Zellteilung ist aus den Fig. 87 und 88 ersichtlich.

ALLGEMEINER TEIL.

I. DER KERN- UND GEISSELAPPARAT DER FLAGELLATEN.

Die vorstehenden Befunde fordern nach verschiedener Richtung zu einer Stellungnahme zu einigen allgemeinen Problemen der Protozoencytologie heraus, vor allem zu den in letzter Zeit vielfach diskutierten Anschauungen über Doppelkernigkeit und den damit verwandten Fragen über Centriole, Geisselbildung etc. Im folgenden seien daher einzelne dieser Fragen gesondert besprochen und die früheren Auffassungen, wie sie hauptsächlich in der gemeinsamen Arbeit von HARTMANN und v. PROWAZEK (1907) niedergelegt sind, ergänzt, erweitert und, wo nötig, revidiert.

1. Centriol.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei allen genauer studierten Flagellaten Centriole im Caryosom nachgewiesen werden konnten. Zum ersten Male hatten SCHAUDINN und v. PROWAZEK (1904) für Trypanosomen das Vorhandensein eines Centriols im Caryosom dargetan, allerdings nur mit der GIEMSA-methode. Späterhin hat dann HARTMANN für *Entamoeba tetragena* und *Limax*amoeben ein Centriol und dessen Verhalten bei der Kernteilung beobachtet (HARTMANN u. v. PROWAZEK (1907), HARTMANN (1908), was HARTMANN's Schüler NAEGLER auf eine grosse Anzahl anderer Amoeben ausdehnen konnte. Der Befund wurde ferner von verschiedenen anderen Autoren für weitere Amoeben-Arten bestätigt sodass die

balho de NAEGLER que o cariozoma das amebas inclue sempre um centriolo, já pode ser considerada como fato certo. O mesmo ficou provado pelas nossas pesquizas sobre flajelados onde (fóra a observação feita por SCHAUDINN e confirmada por CHAGAS e ROSENBUSCH em 1909 com metodos citolojicos mais aperfeiçoadas) o centriolo só tinha sido assinalado na *Oxyrrhis* por KEYSSELITZ, e na *Copromonas* por BERLINER. As observações enumeradas se juntam ás nossas feitas em varias familias de *Protomonadinae* (*Cercomonas*, *Spongomonas*, *Cyathomonas*), a *Binucleata Prowazekia*, a *Cryptomonadina Chilomonas* e a *Euglenoidea Paranema*. Assim, foi o fato verificado em todas as ordens de euflajelados e o mesmo pode-se dizer dos dinoflajelados, em vista de pesquizas feitas por JOLLOS no « *Institut für Infectionskrankheiten* » e ainda não publicadas. Não sómente em amebas e mastigoforos se conhecem hoje centriolos no interior do cariozoma, mas tambem, em tecamebas (observações ineditas de SCHAUDINN em *Chlamydophrys* e *Centropyxis* e nossas em *Arcella*), em heliozoarios (KEYSSELITZ 1908, ZUELZER 1909), radiolarios (HARTMANN & HAMMER 1909) mixosporidios (AWERINZEW, KEYSSELITZ 1908) e coccidios (JOLLOS). Apenas os infuzorios parecem fazer exceção, tambem aqui achamos centriolos em algumas especies novas e temos observações que podem explicar a auzencia aparente dos centriolos e que serão referidas nestas « Memorias » em trabalhos de CHAGAS sobre novos infuzorios parazitarios e de HARTMANN sobre a *Entamoeba testudinis*.

Emfim, a prezença constante de organs centrais no cariozoma de todos os protozoarios pode hoje ser considerada um fato cientifico bem estabelecido, ficando assim a definição do cariozoma diretamente dependente da prezença do centriolo o que permite precizal-o melhor e distinguil-o dos nu-

Anschauung, die in NAEGLER's Arbeit ausgesprochen ist, dass das Caryosom der Amoeben stets ein Centriol einschliesst, jetzt schon als gesichert gelten kann. Dasselbe haben nun auch unsere Untersuchungen für die Flagellaten gezeigt, wo ausser für Trypanosomen (der SCHAUDINN'sche Befund ist inzwischen von ROSENBUSCH (1909) und CHAGAS (1909) mit cytologisch einwandfreien Methoden bestätigt) bisher nur für *Oxyrrhis* durch KEYSSELITZ und *Copromonas* durch BERLINER ein Centriol bekannt war. Dazu kommen jetzt unsere Befunde für verschiedene Familien der Protomonadinen (*Cercomonas*, *Spongomonas*, *Cyathomonas*) ferner für die Binucleate *Prowazekia*, die Cryptomonadine *Chilomonas* und die Euglenoidee *Peranema*. Somit liegen nun für sämtliche Ordnungen der Euflagellaten positive Befunde vor. Für Dinoflagellaten gilt aber nach unveröffentlichten Untersuchungen von JOLLOS aus dem Institut für Infektionskrankheiten das Gleiche. Aber nicht nur für Amoeben und Mastigophoren, sondern auch für Thecamoeben, Befunde von SCHAUDINN (Nachlass), an *Clamydophrys* und *Centropyxis*, sowie unveröffentlichte Beobachtungen von uns an *Arcella*, Heliozoen (KEYSSELITZ 1908, ZÜLZER 1909) Radiolarien (HARTMANN und HAMMER 1909) Myxosporidien (AWERINZEW, KEYSSELITZ 1908) und Coccidien (JOLLOS) sind jetzt Centriole im Caryosom bekannt. Eine Ausnahme scheinen nur die Infusorien zu machen, doch haben wir auch hier bei einigen neuen Arten Centriole gefunden und verfügen über Beobachtungen, die das scheinbare Fehlen von Centriolen zu erklären vermögen, worüber in den folgenden Arbeiten in dieser Zeitschrift von CHAGAS über neue parasitische Infusorien und HARTMANN über *Entamoeba testudinis* berichtet werden wird.

Kurz das allgemeine Vorhandensein von Zentralorganen im Caryosom aller Protozoen kann jetzt als eine wohlbegründete wissenschaftliche Tatsache gelten, und man kann daraufhin jetzt den Begriff des Caryosoms direkt von dem Vorhandensein

cleolos cromaticos (anfinucleolos). Si numa celula de protozoario o centriolo é encontrado fóra do cariozoma ou do nucleo, é possivel provar que teve a sua orijem no cariozoma como mostraram SCHAUDINN (1896) e KEYSSELITZ (1908) em *Acanthocystis*, KEYSSELITZ (1908) em *Myxobolus*, HARTMANN e CHAGAS (não publicado) em hemogregarinas de cobras. A mesma geneze têm os centrozomios das gregarinas, segundo SCHNITZLER. Emquanto até ha pouco era opinião corrente que os protozoarios com poucas exceções não aprezentam centriolos, hoje, a prezença constante delles póde ser aceita, pelo menos, com o mesmo direito que nos metazoarios. Esta verificação inesperada e obtida em tão breve tempo justifica a esperança que tambem nas plantas, onde a existencia de centros tem sido negada muitas vezes, novos exames feitos com orientação nova conseguirão demonstral-a.

2. Estrutura do nucleo e mitoze.

As nossas verificações combinadas com as de pesquizadores anteriores parecem dar a possibilidade de estabelecer os traços principais da filojenia dos nucleos e da mitoze nos protozoarios. Dous dicipulos de HARTMANN, NAEGLER e BERLINER já esboçaram esta serie evolutiva, um para as amebas e outro para os flajelados. Para os ultimos queremos dar descrição mais minucioza. Os nucleos de todos os flajelados são veziculozos e da sua estrutura e divizão pode-se estabelecer *trez tipos* principais que chamamos nucleos de cariozoma: *O primeiro* reune aquelles nos quais todo o material generativo é contido no cariozoma o qual fornece o material para toda a figura mitotica. Neste tipo encontramos uma serie de variações. A mais simples e, em nossa opinião, mais primitiva consiste em cariozoma simples com zona de suco nuclear sem granulações de cromatina e sem membrana nuclear. Nas amebas é muito espalhada (VAHLKAMPF 1905, NAEGLER 1909), nos flaeines Centriols abhängig machen und ihn dadurch schärfer fassen und von chromatischen Nucleolen (Amphinucleolen) unterscheiden. Wenn sich in einer Protozoenzelle ein Centriol ausserhalb des Caryosoms resp. Kernes findet, dann sich aber, wie SCHAUDINN (1896) und KEYSSELITZ (1908) für *Acanthocystis*, KEYSSELITZ (1908) für *Myxobolus*, HARTMANN und CHAGAS (unediert) für Hämogregarinen von Schlangen nachgewiesen haben, seine Genese aus dem Caryosom nachweisen. In ähnlicher Weise kommt diese Genese auch den Centrosomen der Gregarinen zu (SCHNITZLER). Während bis vor kurzem allgemein angenommen wurde, dass die Protozoen mit wenigen Ausnahmen keine Centren aufweisen, kann jetzt das allgemeine Vorkommen derselben hier mindestens mit derselben Berechtigung angenommen werden, wie bei den Metazoen. Diese unvermutete und in so wenigen Jahren erfolgte Erkenntnis lässt die Hoffnung berechtigt erscheinen, dass auch bei Pflanzen, wo bisher Centren vielfach in Abrede gestellt werden, dieselben bei neuerer Untersuchung unter neuen Gesichtspunkten sich ebenfalls noch finden lassen.

2. Kernbau und Mitose.

Unsere Befunde scheinen uns, im Zusammenhang mit denen früherer Untersucher, ferner die Möglichkeit zu bieten, die Hauptlinien der Phylogenie der Kerne und der Mitose bei den Flagellaten aufzustellen. Die beiden Schüler von HARTMANN, NAEGLER und BERLINER, haben schon, ersterer für Amoeben, letzterer für Flagellaten, eine derartige Entwicklungsreihe kurz skizziert. Hier sei dies nun für Flagellaten genauer aufgeführt.

Die Kerne sämtlicher Flagellaten sind bläschenförmig. Wir können drei Haupttypen in Kernbau und Teilung bei ihnen aufstellen: Der *erste* Typ umfasst die *Caryosomkerne*, wie wir sie nennen wollen, bei denen alles generative Material im Caryosom enthalten ist und mithin die ganze Mitosefigur sich nur aus Caryosommaterial aufbaut. Bei diesem Typ treffen wir nun eine ganze Reihe von Variationen

jelados, pelo contrario, só parece existir no nucleo locomotor dos binucleados. Como ficou provado pelas investigações de NAEGLER não se pode aqui falar em duplicidade nuclear no nucleo em repouzo. De outro lado aparece uma duplicidade da cromatina por ocazião da mitoze, podendo-se distinguir calotas polares com centriolos ricos em cromatina, como componente locomotor do nucleo da placa equatorial generativa munida de cromozomios. E' muito frequente nos flajelados uma variedade do nucleo de cariozoma que só se distingue do das amebas, tipo *limax*, por haver membrana nuclear e granulações de cromatina bastante raras no nucleo exterior, sendo que estes ultimos se desprenderam do cariozoma em consequencia de alterações ciclicas (*Cercomonas*, *Monas*, *Oicomonas*, *Bicosoeca*). Infelizmente, nestas mesmas formas só raras vezes se encontraram fazes de divizão, mostrando todas um estrangulamento do cariozoma aparentemente amitotico (*Cercomonas* e *Monas*). Pode-se, todavia, prezumir que, procurando com insistencia aqui tambem se acharão fazes de verdadeira mitoze como nas amebas *limax* e nos tripanozômos (ROSENBUSCH e CHAGAS); seria especialmente interessante verificar neste tipo mais simplificado de nucleo flajelar a maneira de se comportar das duas componentes nucleares, a placa generativa com cromozomios e a calota polar locomotora com centriolo. Na *Spongomonas*, onde o nucleo em repouzo mostra o mesmo gráu de dezenvolvimento, a parte locomotora do nucleo é reprezentada, apenas, por um fuzo acromatico com centriolos, formando o resto da substancia do cariozoma um anel compacto de cromozomios. Neste cazo julgamos que a componente nuclear locomotora perdeu o material cromatico em consequencia de diferenciação intensa; assim observamos como um nucleo de cariozoma, aliaz de natureza primitiva, alcança um estado da parte locomotora do nucleo geralmente só conhecido nos metazoan. Die einfachste und unserer Meinung nach ursprünglichste ist ein einfaches Caryosom mit Kernsaftzone ohne Chromatinkörner und ohne Kernmembran. Sie findet sich sehr verbreitet bei Amoeben (VAHLKAMPF 1905, NAEGLER 1909), bei Flagellaten scheint sie dagegen nur in dem lokomotorischen Kern der Binucleaten vorzuliegen. Wie die Untersuchungen von NAEGLER gezeigt haben, kann von einer Doppelkernigkeit am ruhenden Kern hier nicht die Rede sein. Dagegen tritt eine Art Bichromaticität bei der Mitose zu Tage, indem stark chromatische Polkappen mit Centriolen als lokomotorische Kernkomponente von der chromosomenführenden generativen Aequatorialplatte sich unterscheiden lassen. Sehr verbreitet ist bei den Flagellaten eine Variante des Caryosomkerns, die sich nur dadurch von dem der *Limax*amoeben unterscheidet, dass eine Kernmembran sowie spärliche Chromatinkörner im Aussenkern vorhanden sind, welch letztere sich infolge von cyklischen Veränderungen vom Caryosom abgeschnürt haben (*Cercomonas*, *Monas*, *Oicomonas*, *Bicosöca*). Leider wurden gerade bei diesen Formen nur sehr selten Stadien der Kernteilung gefunden, die alle nur eine scheinbar amitotische Durchschnürung des Caryosoms zeigen (*Cercomonas* und *Monas*). Doch ist zu vermuten, dass auch hier wie bei *Limax*amoeben und Trypanosomen (ROSENBUSCH und CHAGAS) bei eifrigem Suchen auch noch echte Mitosestadien gefunden werden, und es wäre von hohem Interesse zu sehen, wie gerade hier bei dem einfachsten Kerntyp der Flagellaten die beiden Kernkomponenten, die generative Chromosomenplatte und die lokomotorische Polkappe mit Centriol sich verhalten. Bei *Spongomonas*, wo der ruhende Kern dieselbe Entwicklungsstufe zeigt, stellt sich der lokomotorische Kernanteil nur als achromatische Spindel mit Centriolen dar, um die das übrige Caryosommaterial einen kompakten Chromosomenring bildet. In diesem Falle hat unserer Meinung nach die lokomotorische Kernkomponente infolge weitgehender Differenzierung ihr chromatisches Material

zoarios. Na *Cyathomonas* o nucleo exterior é mais dezenvolvido, talvez de acordo com a diferenciação, em geral maior, das organelas vejetativas, mas, assim mesmo, é puramente vejetativo. Todavia, a mitoze do cariozoma é mais primitiva do que na *Spongomonas*; a parte locomotora do fuzo é mais grossa, contendo substancia cromatica e formando claramente calotas polares. O mesmo grau de dezenvolvimento da mitoze observa-se no binucleado *Prowazekia*, onde, todavia, tambem o nucleo em repouzo equivale a nucleo mais primitivo, quazi destituido de nucleo exterior. A parte locomotora do nucleo fornece calotas polares semelhantes a nucleos e, depois da divizão, durante as telofazes, por algum tempo as duas componentes são colocadas uma ao lado da outra quazi como se se tratasse de dous nucleos separados. Todavia, em outros binucleados bem estudados, *Trypanosoma*, *Haemoproteus* (Rosenbusch) e *Schizotrypanum* (Chagas) a componente locomotora do nucleo tem já a sua parte cromatica muito reduzida, as calotas nucleares são pequenas, a figura acromatica fuziforme, lembrando tudo o que se observa na *Spongomonas*.

Assim observamos nas protomonadinas e nos binucleados uma evolução do nucleo de cariozoma primitivo e da divizão deste, como é conhecido da *Amoeba limax*, em duas direções absolutamente independentes entre si. A primeira conduz á formação de nucleo exterior, trofico mais ou menos dezenvolvido (*Cyathomonas*) está em relação com as alterações ciclicas do cariozoma. Esta evolução é continuada no *Bodo lacertae* e nas tricomonadas, sem todavia achar na serie dos flajelados tão grande diferenciação como, por exemplo, entre as amebas, nas entamebas (veja-se o trabalho de Hartmann sobre *Entamoeba testudinis*). A segunda direção evolutiva consiste na involução da parte cromatica da componente locomotora do nucleo combinada com diferverloren, und so sehen wir bei einem sonst primitiven Caryosomkern einen Zustand des lokomotorischen Kernanteils erreicht, wie sonst nur bei den Metazoen. Bei *Cyathomonas* ist, vielleicht im Zusammenhang mit ihrer sonstigen höheren Ausbildung der vegetativen Organellen, der Aussenkern stärker entwickelt, aber ebenfalls rein vegetativ. Die Caryosommitose ist dagegen primitiver wie bei *Spongomonas*; der lokomotorische Teil der Spindel ist mehr kolbig, enthält lokomotorische Substanz und bildet deutliche Polkappen. Denselben Entwicklungsgrad der Mitose weist die Binucleate *Prowazekia* auf, bei der allerdings auch der ruhende Kern als primitiverer Flagellatenkern fast ohne allen Aussenkern gelten muss. Der lokomotorische Kernanteil liefert kernartige Polkappen und nach der Kernteilung liegen in den Telophasen die beiden Kernkomponenten eine Zeit lang fast wie zwei getrennte Kerne in einer gemeinsamen Kernhöhle nebeneinander. Bei anderen genauer studierten Binucleaten, *Trypanosoma*, *Haemoproteus* (Rosenbusch) und *Schizotrypanum* (Chagas) ist jedoch die lokomotorische Kernkomponente schon stark in ihrem chromatischen Teil reduziert; die Polkappen sind klein, die achromatische Figur ist spindelförmig, also alles schon ähnlich wie bei *Spongomonas*.

Wir finden mithin bei den Protomonadinen und Binucleaten nach zwei Richtungen hin eine Entwicklung des ursprünglichen Caryosomkernes und dessen Teilung, wie sie von *Limax*amoeben bekannt ist, zwei Richtungen, die vollkommen unabhängig von einander verlaufen. Die eine führt zur Ausbildung eines mehr oder minder stark entwickelten trophischen Aussenkernes (*Cyathomonas*) und steht mit den cyklischen Veränderungen des Caryosoms im Zusammenhang. Diese wird bei *Bodo lacertae* und *Trichomanaden* noch weitergeführt, findet aber in der Flagellatenreihe nicht die grosse Ausbildung, wie z. B. bei den Amoeben (Entamoeben) (siehe darüber die Arbeit von Hartmann über *Entamoeba testudinis*). Die zweite Entwicklungsrichtung besteht in einer

renciação maior da parte acromatica que conduz á formação completa de fuzo, como se observa nos metazoarios. Como vimos, aparece já este tipo nas protomonadinas e mesmo em fórmas que, como a *Spongomonas* ocupam pozição muito primitiva na outra direção.

O *segundo* tipo principal do nucleo de flajelados é reprezentado por nucleos com nucleo exterior permanente que, todavia, não é puramente trofico, mas contem ainda substancia generativa, a qual nas formas mais elevadas constitue uma placa equatorial com cromozomios bem nitidos. O cariozoma, porém, conserva tambem o carater de nucleo, reprezentando agora unicamente a componente locomotora do nucleo. A estrutura é alveolar ; divide-se em fórma de halteres (divizão amitotica dos autores) e ás vezes forma até um fuzo central de estrutura alveolar. Este tipo póde ser derivado do primeiro ; basta que nos cazos, onde a substancia generativa, tambem no nucleo em repouzo, se acha limitada á zona exterior do cariozoma (*Cyathomonas*), se suponha esta zona separada de modo a permanecer no nucleo exterior.

Dos cazos até hoje conhecidos deste tipo nuclear o mais simples parece-nos o da *Chilomonas*, mas, infelizmente, só se conhecem poucas fazes da divizão destas. Encontra-se tambem ainda, em modo bastante simples, numa *Euglenoidea* primitiva, a *Copromonas major*, segundo Berliner (1909) onde o cariozoma forma até um fuzo completo com uma especie de placa equatorial, emquanto a substancia exterior parece distribuir-se de modo mais irregular. Em outras euglenoideas como em *Euglena* (Blochmann, Keuten), *Eutreptia* (Steuer), *Peranema* etc. o cariozoma tem a estrutura alveolar e divide-se em forma de halteres ; mas, assim mesmo, conserva o seu carater nuclear. O nucleo exterior generativo aprezenta tranzições diferentes, de for-

Rückbildung des chromatischen Anteils der lokomotorischen Kernkomponente, verbunden mit einer höheren Differenzierung des achromatischen Anteils, die zu einer kompletten Spindelbildung in ähnlicher Weise wie bei den Metazoen führt. Wie wir gesehen haben, findet sich dieser Typ schon bei Protomonadinen, ja sogar bei Formen, die, wie *Spongomonas*, nach der ersten Richtung hin noch auf einer sehr primitiven Stufe stehen.

Der *zweite* Haupttyp der Flagellatenkerne wird repräsentiert durch Kerne mit einem dauernden Aussenkern, der aber nicht rein trophisch ist, sondern generatives Material enthält, das bei höheren Formen eine Aequatorialplatte mit scharf ausgeprägten Chromosomen bildet. Das Caryosom behält aber gleichfalls kernartigen Charakter und stellt nun allein die lokomotorische Kernkomponente dar. Es ist meist wabig gebaut, teilt sich hantelförmig (sog. amitotisch) und bildet öfters sogar eine wabig gebaute Zentralspindel. Diesen Typ kann man von dem ersten in der Weise ableiten, dass man bei solchen Fällen, wo das generative Material auch im Ruhekern schon auf die äusserste Zone des Caryosoms beschränkt war (*Cyathomonas*), sich einfach diese Zone abgetrennt denkt, sodass sie dann dauernd im Aussenkern läge.

Der einfachste bisher bekannte Fall dieses Kerntypus ist wohl *Chilomonas*, wovon wir leider nur zu wenig Teilungsstadien kennen. In gleichfalls noch einfacher Weise findet er sich ferner bei der primitiven Euglenoidee *Copromonas major* nach Berliner 1909, wo das Caryosom sogar eine vollkommene Spindel mit einer Art Aequatorialplatte bildet, während das Aussenmaterial mehr unregelmässig verteilt zu werden scheint. Bei anderen Euglenoideen, wie *Euglena* (Blochmann, Keuten), *Eutreptia* (Steuer), *Peranema* etc. ist das Caryosom wabig gebaut und teilt sich mehr hantelförmig, behält aber auch hier kernartigen Charakter. Der generative Aussenkern zeigt verschiedenartige Uebergänge von Formen, wo die generativen Chromatinkörner scheinbar regellos (ami-

mas onde as granulações de cromatina generativa parecem distribuir-se de modo irregular (amitotico?) até a outras, onde constituem cromozomios bem nitidos em numero determinado (*Peranema*). Frequentemente nas telofazes as duas partes do nucleo, o cariozoma (componente locomotora) e o nucleo exterior (cromozomios generativos) se acham numa cavidade nuclear comum dispostos como dous nucleos completamente separados (Peranema), precizamente como já observámos em algumas formas do primeiro tipo nuclear (*Prowazekia*). Registrámos tambem que este tipo nuclear póde tambem ser encontrado nas amebas e tecamebas, aprezentando as varias fazes de evolução. Assim a *Amoeba diploidea* (Hartmann e Naegler) reprezenta um cazo primitivo deste nucleo, emquanto nucleo e mitoze de *Chlamidophrys*, segundo estudos não publicados de Schaudinn lembram o que se observa em *Peranema*, como já foi notado na parte especial. Finalmente a *Amoeba diplomitotica* descrita por Aragão em 1909 pode ser comparada á divizão de *Copromonas major*, com a diferença que no nucleo exterior se forma uma placa de cromozomios distintos. O segundo tipo principal acima descrito é encontrado entre os flajelados em toda a ordem das Euglenoideas, assim como na criptomonadina *Chilomonas* e nos dinoflajelados, segundo estudos ainda inéditos de Jollos.

O *terceiro tipo nuclear* que convem distinguir está em relação estreita com o segundo. Tambem aprezenta um nucleo exterior generativo e no estado de repouzo existe um cariozoma cromatico. Na mitoze, porem, é o cariozoma completamente dissolvido; forma-se um fuzo acromatico, apenas com centriolo nos polos e a placa equatorial mostra cromozomios distintos formados, ao que parece, egualmente de substancia do nucleo exterior e do cariozoma. Este tipo tambem pode ser derivado do primeiro, partindo de fórmas parecidas a *Spongomo-*

totisch?) verteilt werden (*Chilomonas*) bis zu solchen, wo sie scharf ausgeprägte zählbare Chromosomen liefern (*Peranema*). Häufig liegen in den Telophasen die beiden Kernteile, das Caryosom (lokomotorische Komponente) und der Aussenkern (generative Chromosomen) in einer gemeinsamen Kernhöhle, wie zwei völlig getrennte Kerne, nebeneinander (*Peranema*), genau wie wir es ja schon bei einzelnen Formen des ersten Kerntypus (*Prowazekia*) gesehen haben. Erwähnt sei noch, dass dieser Kerntyp in seinen verschiedenen Ausbildungen sich auch bei Amoeben und Thecamoebem findet. So stellt die *Amoeba diploidea* (Hartmann und Naegler) einen primitiven Fall dieses Typus dar, während der Kern und die Mitose von *Chlamydophrys* nach Schaudinn (Nachlass) etwa mit den Verhältnissen von *Peranema* übereinstimmen, wie im speziellen Teil schon hervorgehoben wurde. Die *Amoeba diplomitotica* schliesslich, die Aragão (1909) beschrieben hat, ist etwa in eine Reihe mit der Teilung von *Copromonas major* zu stellen, nur mit dem Unterschied, dass im Aussenkern eine Chromosomplatte mit deutlichen Chromosomen gebildet wird. Der eben geschilderte zweite Haupttyp findet sich bei Flagellaten in der ganzen Ordnung der Euglenoideen, ferner bei der Cryptomonadine *Chilomonas*, sowie nach unveröffentlichten Untersuchungen von Jollos bei den *Dinoflagellaten*.

Der *dritte* Kerntypus, den wir unterscheiden wollen, schliesst sich dem zweiten eng an. Er enthält ebenfalls stets einen generativen Aussenkern und im Ruhestand ist ein chromatisches Caryosom vorhanden. Bei der Mitose dagegen wird das Caryosom vollkommen aufgelöst; es entsteht eine achromatische Spindel nur mit Centriolen an den Polen und die Aequatorialplatte zeigt bestimmte Chromosomen, zu deren Bildung, wie es scheint, Aussenkern und Caryosommaterial in gleicher Weise beitragen. Auch dieser Typ kann direkt von dem ersten abgeleitet werden, wenn man von Formen ausgeht, wie etwa *Spongomonas* und *Cyathomonas*, wo ja auch schon

nas e *Cyathomonas*, onde, tambem, a componente locomotora inteira apenas produz um fuzo completamente acromatico. Basta supor que, de modo egual, como no segundo tipo, parte ou a totalidade da substancia generativa se desprendeu da zona periferica do cariozoma, permanecendo no nucleo exterior, mesmo em periodo de repouzo. Este terceiro tipo se limita excluzivamente ás fitomonadinas (Dangeard, Hartmann, v. Prowazek, Reichnow etc.). Infelizmente, a geneze do fuzo ainda não foi minuciozamente estudada.

3. Aparelho flajelar.

Já em 1904 v. Prowazek em trabalho sobre flajelados estabeleceu quatro tipos de inserção dos flajelos. Os estudos mais recentes não só corroboraram a distinção destes tipos mas, tambem, aprofundaram-lhes a compreensão, partindo da descoberta fundamental de Schaudinn (1904) sobre a geneze nuclear do flajelo nos tripanozômos.

O *primeiro* e mais simples destes tipos de inserção flajelar mostra o flajelo, nacendo diretamente do centriolo incluido no cariozoma. Neste cazo a geneze póde ser considerada diretamente como divizão heteropolar do cariozoma, ou antes, do centriolo, transformando-se a centrodesmoze dos centriolos filhos (em via de afastamento) diretamente em flajelo. Parece este tipo existir apenas nas rizomastijinas.

No *segundo* tipo o flajelo nace de granulação bazal ligada por sua vez ao cariozoma ou centriolo deste, por meio de fibrila, o rizoplasto. Como na parte especial ficou demonstrado para varias fórmas, a granulação bazal e o rizoplasto que a une ao cariozoma rezultam de uma primeira divizão heteropolar do cariozoma ou do centriolo, reprezentando o rizoplasto centrodesmoze permanente. A propria formação do flajelo pela granulação bazal póde, então, ser considerada segunda divizão he-

die ganze lokomotorische Komponente eine rein achromatische Spindel lieferte. Man braucht sich nur vorzustellen, dass ähnlich wie beim zweiten Typ, ein Teil oder das ganze generative Material von der Aussenzone des Caryosoms sich abgetrennt hat und dauernd auch im Ruhezustande im Aussenkern sich findet. Dieser dritte Typus ist ausschliesslich auf die *Phytomonadinen* beschränkt (Dangeard, Hartmann, v. Prowazek, Reichenow etc.). Leider ist die genaue Genese der Spindel noch nicht eruiert.

3. Geisselapparat.

V. Prowazek (1904) hatte schon in seiner Flagellatenarbeit vier Typen der Geisselinsertion bei den Flagellaten aufgestellt. Die neueren Untersuchungen haben die Richtigkeit derselben erwiesen und zugleich im Anschluss an die grundlegende Entdeckung Schaudinn's (1904) über die Genese der Geissel aus dem Kern bei den Trypanosomen zu einem tieferen Verständnis der verschiedenen Typen geführt.

Der *erste*, einfachste Typus der Geisselinsertion ist der, dass die Geissel direkt von dem im Caryosom gelegenen Centriol ausgeht. In diesem Falle kann die Genese einfach als eine heteropole Teilung des Caryosoms resp. Centriols aufgefasst werden, wobei die Centrodesmose der auseinanderrückenden Tochtercentriole direkt zur Geissel wird. Dieser Typus scheint nur bei Rhizomastiginen vorzukommen.

Bei dem *zweiten* Typus der Geisselinsertion entspringt dieselbe von einem *Basalkorn*, das seinerseits wieder durch eine Fibrille, den *Rhizoplasten*, mit dem Caryosom, resp. dessen Centriol, verbunden ist. Wie wir im speziellen Teil für verschiedene Formen nachgewiesen haben, entsteht das Basalkorn, sowie der dasselbe mit dem Caryosom verbindende Rhizoplast, durch eine erste heteropole Teilung des Caryosoms resp. Centriols, wobei der Rhizoplast die erhaltenbleibende Centrodesmose darstellt. Die eigentliche Geisselbildung von dem Basalkorn aus kann dann als eine zweite heteropole Mitose dieses zweiten (sekun-

teropolar deste granulo que reprezenta o segundo centriolo recemformado. Assim, a granulação bazal neste cazo equivale aos centriolos secundarios na histojeneze dos espérmios. Como mostrámos na parte geral e aprofundaremos no capitulo de sistematica, este tipo flajelar se observa em todas as protomonadinas e nas fitomonadinas. Notamos tambem que o rizoplasto ou centrodesmoze primeiro, depois da formação completa do flajelo, pode ser reabsorvido, em parte, ou totalmente.

Nas formas primitivas deste tipo, o flajelo com a granulação bazal e o rizoplasto é destruido antes da divizão e formado de novo pelos nucleos filhos (*Cercomonas*, *Spongomonas*); nas fórmas mais elevadas, pelo contrario, a granulação bazal póde tornar-se de todo independente do nucleo e dividir-se separadamentente.

O *terceiro* tipo de estrutura flajelar que só se encontra nos binucleados (tripanozômos e generos vizinhos) oferece especial interesse. Como no segundo tipo o flajelo tambem aqui nace de granulação bazal ligada pelo rizoplasto ao cariozoma de um nucleo, mas este não é, como no primeiro cazo, o unico nucleo principal correspondente ao nucleo ordinario e primitivo dos flajelados (*Hauptkern*), mas um nucleo flajelar (cinetonucleo, blefaroplasto) separado e independente do nucleo principal. Como SCHAUDINN mostrou primeiro (1904), depois da fecundação o primeiro nucleo fórma por mitoze heteropolar no pólo grande o nucleo principal e no pequeno o segundo nucleo locomotor, podendo os dous cariozomas ser ligados por uma centrodesmoze que dezaparece mais tarde. Assim, a formação do nucleo flajelar rezulta da primeira mitoze heteropolar, conservando os dous decendentes o carater nuclear, quando no segundo tipo fica um delles completamente reduzido em forma de centriolo (granulação bazal). O nucleo flajelar posteriormente,

dären) Centriols (Basalkornes) betrachtet werden. Das Basalkorn ist in diesem Falle den sekundären Centriolen bei der Spermio-Histogenese gleichzustellen. Wie im speziellen Teil gezeigt und wie in dem systematischen Kapitel noch eingehender ausgeführt werden wird, findet sich dieser Geisseltypus bei allen *Protomonadinen* und den *Phytomonadinen*. Erwähnt sei noch, dass der Rhizoplast (die erste Centrodesmose) nach vollkommener Ausbildung der Geissel teilweise oder ganz eingeschmolzen werden kann. Bei den einfachen Formen dieses Typus geht die Geissel samt Basalkorn und Rhizoplast vor jeder Teilung zugrunde und wird von den Tochterkernen von neuem gebildet (*Cercomonas*, *Spongomonas*); bei höheren dagegen kann das Basalkorn vom Kern unabhängig werden und sich selbständig teilen (*Cyathomonas*).

Von besonderem Interesse ist der *dritte* Typus des Geisselbaues der Flagellaten, der sich nur bei den *Binucleaten* (Trypanosomen und Verwandten) findet. Hier entspringt, wie beim zweiten Typ, die Geissel von einem Basalkorn, das seinerseits durch einen Rhizoplasten mit dem Caryosom eines Kerns in Verbindung steht. Dieser Kern ist aber nicht, wie im ersten Fall, der einzige Hauptkern, der dem gewöhnlichen ursprünglichen Kern der Flagellaten entspricht, sondern ein besonderer, vom Hauptkern unabhängiger Geisselkern (Kinetonucleus, Blepharoplast). Wie SCHAUDINN (1904) zuerst gezeigt hat, entsteht nach der Befruchtung aus dem einen Kern durch heteropole Mitose am grossen Pole der Hauptkern, am kleinen dieser zweite lokomotorische Kern, wobei die beiden Caryosome noch durch eine Centrodesmose verbunden sein können, die später eingeschmolzen wird. Die Bildung des Geisselkernes geschieht mithin durch die erste heteropole Mitose, bei der jedoch beide Abkömmlinge dauernd ihren Kerncharakter bewahren, während beim zweiten Typus das eine Teilprodukt hierbei vollkommen reduziert, nur ein Centriol (Basalkorn) ist. Von dem Geisselkern aus wird dann in derselben Weise, wie beim

como o nucleo principal no segundo tipo dá orijem ao flajelo por meio de duas mitozes heteropolares com produtos de redução, de modo que neste cazo o flajelo reprezenta, apenas produto da terceira divizão. A divizão do nucleo flajelar (blefaroplasto) e nucleo principal faz-se independentemente; o antigo flajelo é apropriado por um dos organismos filhos, emquanto no outro ha formação de novo flajelo, por parte do blefaroplasto.

Tambem o *quarto* tipo que estabelecemos de formação de flajelo pode explicar-se por divizão tripla do centriolo, mas aqui o produto da primeira divizão não é um nucleo completo, como no primeiro cazo, mas, como no segundo tipo flajelar, apenas um centriolo (granulação bazal). Geneze deste tipo só se conhece numa forma, na *Copromonas major* (Berliner 1909). Durante a telofaze da mitoze o centriolo produz por mitoze heteropolar um rizoplasto com granulação bazal que, assim, é primeiramente ligado ao centriolo do nucleo principal (primeira divizão centriolar e centrodesmoze). Em seguida, provavelmente, apoz segunda divizão do centriolo primitivo, o rizoplasto se afasta completamente do nucleo, terminando então em segunda granulação bazal no interior da celula. O flajelo proprio é formado da primeira granulação bazal por terceira divizão (centrodesmoze). O rezultado é, como nos binucleados, uma independencia completa do nucleo por parte do aparelho flajelar; apenas a geneze é diferente. Em todas as outras formas que aprezentam este tipo flajelar (as outras euglenoideas e a criptomonadina *Chilomonas*) a formação do flajelo é de todo independente do nucleo durante a divizão como nos binucleados, pois que as granulações bazais aqui, como lá o blefaroplasto, se dividem separadamente, produzindo novos flajelos.

zweiten Typus vom ursprünglichen Kern aus, die Geissel durch zwei heteropole Mitosen mit reduzierten Sprösslingen gebildet, sodass in diesem Falle die Geissel erst das Produkt der dritten Teilung darstellt. Bei der Teilung, teilt sich der Geisselkern (Blepharoplast) und Hauptkern gesondert, die alte Geissel wird von dem einem Tochtertier übernommen, während in dem andern vom Blepharoplasten eine neue gebildet wird.

Auch der *vierte* Typus der Geisselbildung, den wir aufstellen wollen, lässt sich auf eine dreifache Teilung des Centriols zurückführen. Hier ist jedoch nicht wie im vorhergehenden Falle das Produkt der ersten Teilung ein kompletter Kern, sondern wie beim zweiten Geisseltypus nur ein Centriol (Basalkorn). Die Genese dieses Typus ist nur bei einer Form, bei *Copromonas major* bekannt (Berliner 1909). Es entsteht während der Telophase der Mitose vom Centriol aus durch eine heteropole Mitose ein Rhizoplast mit Basalkorn, der mithin wie bei Protomonadinen zunächst direkt mit dem Centriol des Hauptkernes zusammenhängt (erste Centriolteilung und Centrodesmose). Nachträglich rückt, wohl nach einer zweiten Teilung des primären Centriols, der Rhizoplast ganz vom Kern ab und endet dann in einem zweiten Basalkorn im Innern der Zelle. Die eigentliche Geissel wird von dem zuerst gebildeten Basalkorn durch eine dritte Teilung (Centrodesmose) gebildet. Das Resultat ist, wie bei den Binucleaten, eine völlige Unabhängigkeit des Geisselapparates vom Kern; nur ist die Genese eine andere. Bei allen andern Formen, die diesen Geisseltyp aufweisen (die übrigen Euglenoideen und die Cryptomonadine *Chilomonas*), ist, wie bei den Binucleaten, auch die Geisselbildung, während der Teilung, vom Kern unabhängig, da die Basalkörper (wie dort der Blepharoplast) sich selbständig teilen und von sich aus die neuen Geisseln bilden.

4. Doppelkernigkeit.

In Weiterführung der Schaudinn'schen Anschauungen, die dieser Forscher sich

4. Duplicidade nuclear.

Em continuação das ideias que SCHAUDINN tinha formado em consequencia das suas descobertas sobre a fecundação e a geneze do aparelho flajelar nos tripanozômos (1904 e 1905), HARTMANN e v. PROWAZEK em 1907 tentaram demonstrar para todas as celulas, tanto dos proto como dos metazoarios, uma duplicidade nuclear, havendo um nucleo locomotor e generativo correspondente ao blefaroplasto dos tripanozômos e outro nucleo trofico e generativo equivalente ao nucleo principal dos tripanozômos. Homologaram a granulação central dos heliozoarios, o nucleo acessorio de *Paramoeba*, o centrozomio de *Actinosphaerium*, os centrozomios das celulas dos metazoarios com o blefaroplasto dos tripanozômos, supondo que nos outros protozoarios o cariozoma se ha de interpretar como nucleo locomotor. As pesquizas posteriores deram a certeza de que a granulação central dos heliozoarios (KEYSSELITZ 1908 e ZUELZER 1909) e o blefaroplasto dos tripanozômos binucleados etc. são, realmente, nucleos completos. Especialmente para os tripanozômidas ROSENBUSCH em 1909 e CHAGAS (1909) mostraram, como nós para a *Prowazekia* que o blefaroplasto se divide por mitoze, de modo que se não póde mais duvidar da sua natureza nuclear. Mas destas [illegible]esmas observações rezulta que tambem es[illegible] nucleos locomotores mostram duas compo[illegible]ntes, uma locomotora (fuzo central e centrio[illegible] e uma placa de cromozomios generativa, [illegible]sto que esta já seja bastante reduzida. Isso [illegible]m conjunto com os conhecimentos obtidos recentemente sobre os nucleos de cariozoma e as suas divizões (amebas *limax*) nos obriga á revizão das opiniões de HARTMANN e v. PROWAZEK. E' verdade que as pesquizas sobre os nucleos de cariozoma e suas divizões executadas precizaauf Grund seiner Entdeckungen über die Befruchtung, sowie die Genese des Geisselapparates bei Trypanosomen, gebildet hatte (SCHAUDINN 1904 u. 1905), haben HARTMANN und v. PROWAZEK (1907) den Versuch unternommen, für alle Zellen der Protozoen wie Metazoen eine Doppelkernigkeit nachzuweisen in einem lokomotorisch generativen Kern, der dem Blepharoplasten der Trypanosomen entspricht und einen trophisch generativen Kern, der dem Hauptkern der Trypanosomen gleichkommt. Dabei haben sie das Centralkorn der Heliozoen, den Nebenkern von *Paramoeba*, das Centrosom von *Actinosphaerium*, die Centrosome der Metazoenzellen mit dem Blepharoplasten der Trypanosomen homologisiert und für alle übrigen Protozoen angenommen, dass dort das Caryosom als lokomotorischer Kern anzusprechen sei. Die seitherigen Untersuchungen haben nun mit Sicherheit erwiesen, dass das Centralkorn der Heliozoen (KEYSSELITZ 1908 und ZÜLZER 1909) und der Blepharoplast der Binucleaten (Trypanosomen etc.) in der Tat komplette Kerne sind. Für dies Trypanosomen haben besonders ROSENBUSCH 1909 und CHAGAS, wie wir oben für *Prowazekia* gezeigt, dass der Blepharoplast sich mitotisch teilt. Seine Kernnatur kann danach nicht mehr in Frage gezogen werden. Gerade diese Beobachtungen haben aber ergeben, dass auch dieser lokomotorische Kern zwei Bestandteile aufweist, eine lokomotorische Komponente (Zentralspindel und Centriole) und eine generative Chromosomenplatte, die allerdings schon etwas reduziert ist. Das nötigt aber, im Zusammenhang mit den neueren Erfahrungen über die primitiven Caryosomkerne und deren Teilung (*Limax*-Amoeben), zu einer Revision der Auffassungen von HARTMANN und v. PROWAZEK. Wohl haben die Untersuchungen über die Caryosomkerne und ihre Teilungen, die, gerade auf Grund der HARTMANN-v. PROWAZEK'schen Auffassung, zum grossen Teil von ihren Schülern ausgeführt wurden, mit Sicherheit dargetan, dass in dem Caryosom ein Cytozentrum ein-

mente em consequencia das opiniões de Hartmann e v. Prowazek e em grande parte por dicipulos destes, levaram á certeza de que no cariozoma se acha um citocentro incluido, como já foi exposto acima ; mas não se pode falar em duplicidade nuclear verdadeira no nucleo de cariozoma, seja do primeiro, seja do segundo tipo. Seria então precizo considerar uma celula de tripanozômo como dotada de quatro nucleos porque aqui cada um dos nucleos, tanto o principal como o flajelar (blefaroplasto), possue um citocentro e substancia generativa. Por isso, parece-nos, hoje, mais correto não falar de duplicidade nuclear no nucleo de cariozoma, mas de compozição de dois componentes diversos, o locomotor (centriolo e plastina) e o generativo. Na realidade conhecemos grande numero de nucleos de cariozoma nos quais realmente parece haver dous nucleos, um dentro do outro, como o mostram as figuras de divizão. Lembramos a divizão nuclear da *Entamoeba buccalis*, (v. Prowazek) e *Entamoeba tetragena* (Hartmann), a divizão das euglenoideas, como, principalmente, a divizão nuclear da *Amoeba diplomitotica* Aragão. Mas, a verdadeira duplicidade nuclear só se dá quando um anfinucleo na divizão produz dous decedentes nos quais as duas componentes nucleares, em geral, já no ato da divizão são distribuidas em gráu diferente, havendo na celula dous nucleos com diferenciação diversa, um com prevalencia da componente trofica e generativa e outro com componente, principalmente locomotora. Neste sentido, ha verdadeira duplicidade nuclear nos tripanozômos e heliozoarios, na parameba e, eventualmente, em todas as celulas de metazoarios cujos dous nucleos (nucleo e centrozomio) mostram, então, o maximo da diferenciação. Repetimos com insistencia que para nós, agora, o termo duplicidade nuclear se funda em uma divizão anterior (cario-

geschlossen ist, wie das oben schon ausgeführt wurde. Aber von einer Doppelkernigkeit im strengen Sinne kann bei einem Caryosomkern, mag er dem ersten oder zweiten Typus angehören, nicht die Rede sein ; denn sonst müsste man eine Trypanosomenzelle eigentlich für vierkernig halten, da ja dort jedem der beiden Kerne, dem Hauptkern, wie dem Geisselkern oder Blepharoplasten ein Cytozentrum und generatives Chromosomenmaterial zukommen. Daher erscheint es uns jetzt richtiger, bei einem Caryosomkern nicht von einer Doppelkernigkeit zu sprechen, sondern nur von einer Zusammensetzung aus zwei verschiedenen Kernkomponenten, einer lokomotorischen (Centriol u. Plastin) und einer generativen. Wohl kennen wir unter den Caryosomkernen eine ganze Anzahl, bei denen tatsächlich, wie besonders die Kernteilungsbilder zeigen, zwei Kerne in einander geschachtelt zu sein scheinen. Wir erinnern nur an die Kernteilung von *Entamoeba buccalis*, (v. Prowazek) und *Entamoeba tetragena* (Hartmann), die Teilung der Euglenoideen, sowie vor allem die Kernteilung von *Amoeba diplomitotica* (Aragão). Wie wir aber oben für die Flagellatenkerne gezeigt haben, scheinen diese Verhältnisse leichter verständlich durch die Annahme einer fortschreitenden Differenzierung und Loslösung der generativen Komponente von dem primitiven Caryosomkern. Eine echte Doppelkernigkeit dagegen ist nur möglich, wenn ein Kern (Amphinucleus) durch Teilung in zwei Abkömmlinge sich teilt, bei denen die beiden Kernkomponenten wohl in der Regel schon direkt bei der Teilung in verschiedenem Grade verteilt werden, sodass zwei verschieden differenzierte Kerne in der Zelle vorhanden sind, einer vorwiegend mit der trophisch-generativen Komponente, der andere vorwiegend mit der lokomotorischen Komponente. In diesem Sinne echte doppelkernige Zellen sind die Trypanosomen, die Heliozoen, Paramoeba und eventuell alle Metazoenzellen, deren beide Kerne dann die extremste Differenz aufwiesen (Kern und Centrosom). Um es nochmals hervor-

zoma). Neste modo de ver a importancia maior é dada á diferenciação nuclear de dous nucleos ou enerjides, separados e consecutivos a uma divizão, sendo que a diferenciação circumpolar por dentro de um nucleo unico (anficarion) não mais se considera duplicidade nuclear como antigamente. Com outras palavras, a definição do nucleo depende da prezença de um centriolo.

Aqui só indicamos rapidamente que fundado neste principio todas as celulas de flajelados podem considerar-se como bi- ou polienerjides, sendo sempre uma organização mais elevada e complexa determinada por maior numero de enerjides. Queremos dizer que cada celula de flajelado pode ser considerada bi-, tri-, tetra- etc. -enerjide conforme a formação dos flajelos e fibrilas se houve uma, duas ou tres divizões de centriolos. Neste cazo tratar-se-ia de celulas polienerjides, cujos elementos (nucleos, enerjides) são deziguais, heterologos em opozição a outras celulas e nucleos polienerjides com enerjides iguais, homologas. (Veja HARTMANN, Nucleos polienerjides, 1909). Este modo de ver significaria mais um passo para a transformação da doutrina das celulas em doutrina das enerjides.

II. SISTEMA DOS FLAJELADOS.

No seu trabalho tantas vezes citado, v. PROWAZEK já instituiu principios para uma revizão dos flajelados, bazeando-se na estrutura nuclear e na inserção dos flajelos. Aqui tentaremos chegar a uma classificação natural dos flajelados, bazeada em numero muito maior de observações e conhecimentos mais aprofundados do aparelho nucleoflajelar como ficaram individuadamente expostos nos capitulos acima.

O *primeiro* tipo da inserção flajelar observa-se nas rizomastijinas, geralmente

zuheben: wir machen den Begriff der Doppelkernigkeit jetzt von einer stattgehabten Zweiteilung (Caryosom) abhängig. Bei dieser Betrachtungsweise ist somit das Hauptgewicht gelegt auf eine Kerndifferenzierung bei zwei, durch Teilung entstandenen, getrennten Kernen oder Energiden, und eine circumpolare Differenzierung innerhalb eines einzigen Kernes (sog. Amphicaryon), wie in der alten Fassung, wird nicht mehr als Doppelkernigkeit anerkannt. Mit andern Worten: der Begriff eines Kernes wird an das Vorhandensein eines Centriols geknüpft.

Dass sich unter Zugrundelegung dieses Prinzips jede Flagellatenzelle als bi- oder polyenergid ansprechen liesse, wobei jede höhere compliziertere Organisation durch eine grösse Anzahl von Energiden bedingt ist, sei hier nur noch kurz angedeutet. Man könnte nämlich jede Flagellatenzelle je nachdem zur Geissel- und Fibrillenbildung eine, zwei, drei etc. Centriolteilungen stattgefunden haben, als eine bi-, tri-, tetra-, etc. -energide Zelle ansprechen. In diesem Falle würde es sich um polyenergide Zellen handeln, deren Elemente (Kerne, Energiden) ungleichwertig, heterolog sind, im Gegensatz zu andern polyenergiden Zellen und Kernen mit gleichwertigen, homologen Energiden. (Vergl. HARTMANN 1909, Polyenergide Kerne). Diese Auffassung würde einen weiteren Schritt bedeuten, die Zellenlehre in eine Energidenlehre umzuwandeln.

II. DAS SYSTEM DER FLAGELLATEN.

In seiner vielfach zitierten Flagellatenarbeit hatte v. PROWAZEK schon auf Grund des Kernbaues und vor allem der Geisselinsertion Prinzipien für eine Revision des Systems der Flagellaten aufgestellt. Im folgenden wollen wir nun gestützt auf das wesentlich erweiterte Beobachtungsmaterial, sowie die vertieften Anschauungen über den Kern-Geisselapparat, die wir in den vorstehenden Kapiteln eingehend erörtert haben, versuchen, endgiltig zu einem natürlichen System der Flagellaten zu gelangen.

colocadas, de acordo com BUETSCHLI, no inicio da sub-classe dos flajelados. Aqui foi demonstrado por PLENGE e v. PROWAZEK na *Mastigamoeba*, GOLDSCHMIDT nas mastijinas, finalmente por v. PROWAZEK e por nós no *Cercobodo* (*Dimastigamoeba*). V. PROWAZEK propuzera opor este grupo como *poliaxonia* aos outros protozoarios monoaxonicos. Tendo as formas superiores destas na sua estrutura nuclear e na sua evolução seguido orientação muito diferente dos outros flajelados (como mostram as pesquizas de GOLDSCHMIDT), parece indicada a separação completa das protomonadinas, como já o fez SENN embora fundado em caracteres que nos parecem insuficientes. Consideramol-as, assim como primeira ordem de flajelados com o nome: *Rhizomastigina*. Não insistiremos na caraterização e divizão do grupo, visto que um de nós intende dar um estudo separado sobre uma *Mastigamoeba* e certa especie de *Cercobodo*.

O *segundo* tipo de inserção flajelar existe principalmente nas protomonadinas com excluzão das rizomastijinas. Deste grupo trataremos mais por menor. Na parte especial estudámos mais minuciozamente o nucleo e o aparelho flajelar de trez especies diversas. Todas ellas têm nucleo veziculozo com cariozoma relativamente grande. O nucleo exterior, pelo contrario, mostra dezenvolvimento variavel nas diversas especies, sem nunca alcançar grande diferenciação, e principalmente não conhecemos exemplo de conter substancia generativa durante a mitoze. Esta é unicamente formada de substancia do cariozoma. O aparelho nuclear em todas as formas é egual em principio, nacendo os flajelos de granulações bazais simples ou duplas (diplozomas), diretamente unidas ao cariozoma (centriolo) por uma fibrila—o rizoplasto. Já v. PROWAZEK havia assinalado estruturas semelhantes em

Der *erste* Typ der Geisselinsertion findet sich nur bei den *Rhizomastiginen*, die meist mit BÜTSCHLI an die Spitze der Flagellaten gestellt werden. Hier ist er von PLENGE und v. PROWAZEK für *Mastigamoeba*, GOLDSCHMIDT für *Mastigina* und v. PROWAZEK und uns für *Cercobodo* (*Dimastigamoeba*) nachgewiesen worden. V. PROWAZEK hatte vorgeschlagen, diese Gruppe als *polyaxonia* den übrigen monaxonen Protomonadinen gegenüberzustellen. Da sie in ihren höheren Formen in Kernbau und Entwicklung nach den Untersuchungen von GOLDSCHMIDT einen ganz anderen Weg eingeschlagen haben, wie die übrigen Flagellaten, so erscheint eine völlige Trennung von den Protomonadinen geboten, was schon SENN, allerdings — unserer Meinung nach — auf Grund unzureichender Merkmale, durchgeführt hat. Wir betrachten sie mithin als erste Ordnung der Flagellaten unter dem Namen *Rhizomastigina*. Auf die genaue Charakteristik und Einteilung der Gruppe wollen wir hier nicht weiter eingehen, da der eine von uns eine besondere Studie über eine Mastigamoebe und Cercobodoart zu bringen beabsichtigt.

Der *zweite* Typ der Geisselinsertion findet sich vorwiegend bei den Protomonadinen, nach Ausschluss der Rhizomastiginen. Mit dieser Gruppe wollen wir uns etwas näher beschäftigen. Im speziellen Teil haben wir von drei verschiedenen Gattungen der Protomonadinen, den Kern und Geisselapparat genauer kennen gelernt. Alle haben bläschenförmige Kerne mit verhältnismässig grossem Caryosom. Der Aussenkern dagegen ist bei den verschiedenen Formen verschieden stark entwickelt, erreicht jedoch nie eine grosse Ausbildung und liefert vor allem niemals, soweit bekannt, generatives Material bei der Mitose. Letztere baut sich ganz aus dem Material des Caryosoms auf. Der Geisselapparat ist bei allen Formen prinzipiell der gleiche, indem die Geisseln von einfachen oder doppelten (Diplosomen) Basalkörnern entspringen, die durch eine Fibrille, den Rhizoplasten direkt mit dem Caryosom (Centriol) in Verbindung stehen.

duas especies de *Monas* e numa *Bicosoeca* marinha ; seguiu o rizoplasto, apenas, até á membrana nuclear e não até ao cariozoma. N'uma especie de *Monas* verificámos que tambem aqui o rizoplasto nace do cariozoma (Fig. 17) ; o mesmo achamos numa especie de *Oicomonas* (Fig. 15) e outra de *Monosiga* (Fig. 16). Em outra craspedomonadina : *Salpingoeca amphoridium*, Burk acaba de descrever organização semelhante. Nas bodonaceas, com as quais se devem colocar tambem as bicozoiceas e formas semelhantes, como mostraram Lauterborn e v. Prowazek, este ultimo achou no *Bodo lacertae* condições analogas. O mesmo podemos assinalar em uma especie livre de *Bodo*, como mostra a figura do texto. Assim a estrutura do aparelho nucleo-flajelar acima descrita existe em todas as familias das protomonadinas com exceção das rizomastijinas e dos tripanozômos.

Trata-se agora de saber como estas podem ser delimitadas contra as formas superiores, as polimastijinas de Blochmann. Das trez familias de polimastijinas já Senn colocou as trimastigaceas e tetramitidas (tricomonadas) ao lado das protomonadinas, em vista da sua estrutura geral, considerando a terceira ordem especial das *Distomatina*. V. Prowazek tambem já havia indicado de modo hipotetico que as tricomonadas podiam pertencer ás protomonadinas, e mais tarde (1904) descreveu tambem na *Trichomonas lacertae* a estrutura do aparelho nucleo-flajelar carateristica para as protomonadinas, mostrando principalmente que as granulações bazais eram ligadas ao cariozoma. E' verdade que, aqui, a zona do nucleo exterior é consideravelmente mais desenvolvida, mas, observámos isso tambem no *Bodo* e outras protomonadinas, por exemplo em *Cyathomonas*. Fatos analogos foram ha

Aehnliche Strukturen von Kern- und Geisselapparat hatte v. Prowazek für zwei *Monas*arten, sowie für eine marine *Bicosoeca* angegeben. Doch hat er dabei den Rhizoplasten nur bis zur Kernmembran, nicht bis zum Caryosom verfolgt. Wir fanden bei einer *Monas*art, dass der Rhizoplast auch hier vom Caryosom ausgeht (Fig. 17) ; genau dasselbe konnten wir ferner bei *Oicomonas* spec. (Fig. 15) und bei einer *Monosiga* spec. (Fig. 16) konstatieren. Für eine andere Craspedomonade *Salpingoeca amphoridium* hat soeben Burk ähnliche Verhältnisse beschrieben. Unter den Bodonaceen, zu denen, wie Lauterborn und v. Prowazek gezeigt haben, eigentlich auch die Bicosoiceen und Verwandte gehören, hat v. Prowazek für *Bodo lacertae* übereinstimmende Befunde mitgeteilt. Wir können dasselbe für eine freilebende *Bodo*-Art berichten, wie Fig. A zeigt. Mithin trifft für sämtliche Familien der Protomonadinen nach Ausschluss der Rhizomastiginen und Trypanosomen der geschilderte Bau von Kern und Geisselapparat zu.

Es fragt sich nun, wie die Abgrenzung derselben gegen höhere Formen — in Betracht kommen nur die *Polymastiginen* von Blochmann—zu geschehen hat. Senn hatte schon zwei von den drei Familien der Polymastiginen, die *Trimastigacea* und die *Tetramitidae* (*Trichomonaden*) auf Grund des allgemeinen Zellbaues zu den Protomonadinen gestellt, während er die dritte Familie als eine besondere Ordnung der *Distomatina* auffasste. Auch v. Prowazek hatte schon vermutungsweise die Zusammengehörigkeit von Trichomonaden zu den Protomonadinen ausgesprochen und später (1904) hat er auch für *Trichomonas lacertae* den für die Protomonadinen charakteristischen Bau von Kern- und Geisselapparat beschrieben, vor allem eine Verbindung der Basalkörner mit dem Caryosom nachgewiesen. Die Aussenkernzone ist hier allerdings beträchtlich stärker ausgebildet, doch trafen wir das ja auch bei *Bodo* und anderen Protomonadinen z. B. *Cyathomonas*. Dieselben Verhältnisse hat soeben

pouco descritos por BENSEN na *Trichomonas intestinalis* e *vaginalis* (1909). Parece, todavia, que muitas vezes nas especies de *Trichomonas* o rizoplasto dezaparece, o que explicaria como WENYON e DOBELL, embora trabalhando com bons metodos não o perceberam. Assinalamos todavia que um de nós, trabalhando com a especie estudada por WENYON, o *Trichomonas muris* conseguiu muitas vezes distintamente perceber o rizoplasto. Assim, parece, que a associação das duas familias, as *Trichomastigaceae* e as *Tetramitidae* com as *Protomonadinae* tem fundamento citolojico bem estabelecido. E' verdade que ultimamente DOBELL homologou as granulações bazais de *Trichomonas* com o blefaroplasto (nucleo locomotor) dos tripanozômos, mas nem as suas investigações, nem as de outros autores podem justificar este modo de ver. Seria precizo então, provar a natureza nuclear destas granulações bazais e a existencia de outras secundarias. Si para outras fórmas deste grupo, principalmente as de vida livre, a citolojia não é conhecida ainda, todavia, e não obstante a interpretação diferente das granulações bazais por DOBELL, esta associação já pode ser considerada bem fundamentada.

Mas tambem a *terceira* familia, as *Polymastiginae*, aprezenta as mesmas relações citolojicas, como em primeiro lugar v. PROWAZEK provou na forma conhecida como *Octomitus muris*. A comunicação de BENSEN (1909) sobre a *Lamblia* como tambem outras pesquizas ineditas de HARTMANN sobre *Lamblia* e *Octomitus* (*Hexamitus*) provam a mesma couza. Os flajelos e o bastonete axial sempre nacem de um grupo de granulações bazais unidas por rizoplasto ao cariozoma do nucleo. Ha apenas uma diferença importante com as tricomonadas: todas as organelas existem em numero duplo. Supondo-se dous individuos de *Trichomastix*

BENSEN (1909) für *Trichomonas intestinalis* und *vaginalis* des Menschen beschrieben. Vielfach scheint allerdings bei *Trichomonas*-Arten der Rhizoplast eingeschmolzen zu werden ; so liesse sich etwa erklären, dass WENYON und DOBELL trotz guter Technik nichts davon beobachtet haben. Doch sei betont, dass der eine von uns bei *Trichomonas muris*, dem Objekt WENYON's den Rhizoplasten häufig deutlich zu sehen bekam. Die Vereinigung dieser beiden Familien, der Trimastigaceen und Tetramitidae mit den Protomonadinen erscheint also auch auf cytologischer Grundlage wohl begründet. Allerdings hat DOBELL neuerdings die Basalkörner von *Trichomonas* dem Blepharoplasten (lokomotorischen Kern) der Trypanosomen gleichgestellt. Doch liegt weder in seinen eigenen Befunden noch in denen anderer Autoren ein stichhaltiger Grund hierfür vor. Denn dazu müsste, wie bei Trypanosomen, die Kernnatur dieser Basalkörner, sowie weitere sekundäre Basalkörner nachgewiesen werden. Für andere, vor allem freilebende Formen dieser Gruppe steht allerdings noch die Cytologie aus. Trotzdem und trotz der Differenz in der Deutung der Basalkörner von DOBELL kann jetzt schon die Vereinigung als wohl begründet angesehen werden.

Aber auch die *Distomatina*, die dritte Familie der *Polymastiginen* weisen die gleichen cytologischen Verhältnisse auf, wie zuerst v. PROWAZEK für den sogenannten *Octomitus muris* gezeigt hat. Die Mitteilung von BENSEN (1909) über *Lamblia* sowie weitere unveröffentlichte Untersuchungen von HARTMANN an *Lamblia* und *Octomitus* (*Hexamitus*) beweisen dasselbe. Stets entspringen die Geisseln und Achsenstäbe von einer Basalkörnergruppe, die durch einen Rhizoplasten mit dem Caryosom des Kerns in Verbindung steht. Nur ein wichtiger Unterschied gegenüber den Trichomonaden etc. ist vorhanden ; es finden sich nämlich sämtliche Organellen doppelt. Wenn man sich seitlich zwei *Trichomatix*-Individuen dauernd fest verschmolzen denkt, dann hat man im Prinzip einen *Octomitus* vor sich,

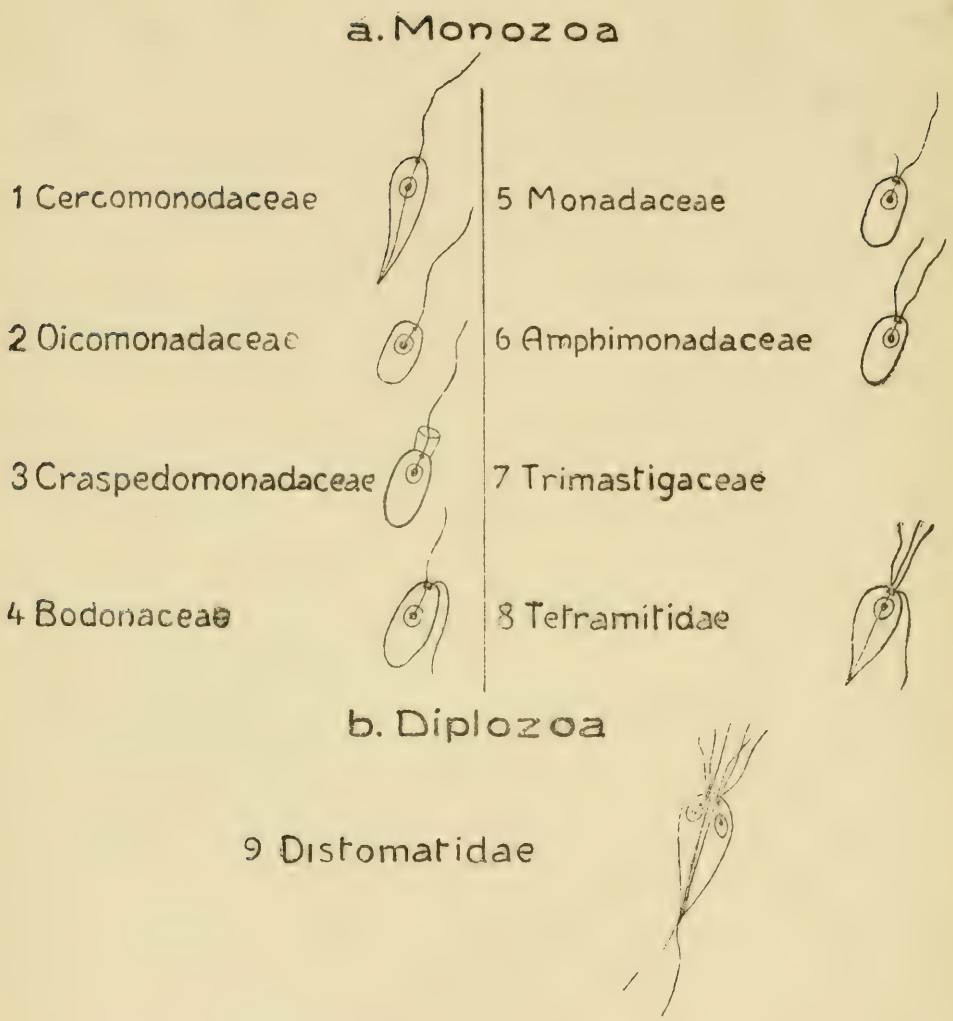
em fuzão completa e permanente, obtem-se a forma de um *Octomitus* sendo que, aqui, os flajelos caudais transpõem a celula em forma de bastonetes axiais. Evidentemente, tambem, as *Distomatinae* de vida livre são outros tantos animais gemeos, como já o prova o orificio oral duplo, carater que sujeriu o nome dado por KLEBS. Aqui tambem BUETSCHLI já notou que *Trepomonas* geralmente, tem dous nucleos separados e DANGEARD o confirmou indubitavelmente. Como esta duplicidade se orijina e como deve ser interpretada, não está ainda esclarecido, mas não tem importancia para a questão que nos ocupa. O que parece certo é que, pelo menos, as formas parazitarias estudadas, fóra da sua duplicidade, concordam citolojicamente com as *Trichomonadae* e consecutivamente com as *Protomonadinae*. Assim, nos parece indicada a sua associação ás ultimas, quereriamos todavia propor separal-as por cauza da sua individualidade dupla com o nome de *Diplozoa* das outras protomonadinas *monozoa*.

A ordem das *Protomonadinae*, portanto, para nós, seria composta das familias constantes do quadro da pajina 118.

Na dispozição das familias seguimos principalmente a BLOCHMANN e SENN, diminuindo apenas de duas as familias de SENN, a saber as *Phalangistidae* e as *Bicosoecaceae*, e juntando as primeiras ás *Craspedomonadaceae*, como o fez BLOCHMANN. O proprio SENN n'uma outra forma, nas espongomonadas não considerou o carater da formação de um envólucro gelatinozo suficiente para estabelecer familia separada e aqui o fato é o mesmo. Quanto ás bicosoecaceas segundo LAUTERBORN e v. PROWAZEK são apenas bodonaceas porque o pedunculo (« *Stiel* ») é mera modificação do flajelo caudal e a formação de um envówobei die beiden Schleppgeisseln als Achsenstäbe durch die Zelle ziehen. Auch die freilebenden Distomatina sind offenbar derartige Doppeltiere, worauf schon die doppelte Mundöffnung hindeutet, der Charakter, wonach ihnen KLEBS den Namen gegeben hat. Und BÜTSCHLI hat auch schon hier beobachtet, dass *Trepomonas* meist zwei getrennte Kerne hat, was neuerdings DANGEARD als sicher erwiesen hat. Wie diese Doppelnatur zustande kommt, und wie sie zu deuten ist, ist noch nicht aufgeklärt. Für die uns hier beschäftigende Frage ist es auch belanglos. Soviel erscheint sicher, dass zum mindesten die bisher untersuchten parasitischen Formen (*Octomitus*, *Lamblia*), abgesehen von ihrer Doppelnatur, cytologisch mit den Trichomonaden, also auch mit den Protomonadinen, übereinstimmen. Wir halten mithin auch ihre Einreihung bei den letzteren für geboten, möchten aber vorschlagen, sie wegen ihrer Doppelnatur als *Diplozoa* den übrigen *monozoen* Protomonadinen gegenüberzustellen.

Die Ordnung der *Protomonadinen* in unserem Sinne umfasst mithin die aus der Zusammenstellung auf Seite 118 ersichtlichen Familien.

In der Gliederung der Familien sind wir hierbei hauptsächlich BLOCHMANN und SENN gefolgt, nur haben wir die Zahl der monozoen Familien gegenüber SENN um zwei verringert, die *Phalangistidae* und die *Bicosöcaceae*. Die erstere haben wir, wie das auch BLOCHMANN tut, bei den Craspedomonaden eingereiht; SENN selbst hatte ja bei einer anderen Form, den Spongomonaden, den Charakter der Gallertbildung als keinen Grund zur Aufstellung einer besonderen Familie anerkannt und dieselbe bei den Amphimonaden untergebracht. Genau so liegt die Sache hier. Die Bicosöcaceen sind nach LAUTERBORN und v. PROWAZEK Bodonaceen, da der sogenannte Stiel nur eine umgewandelte Schleppgeissel darstellt und die Gehäusebildung auch nicht zur Aufstellung einer besonderen Familie genügt. Für unsere erste Familie haben wir wieder den alten Namen Cercomonadaceen gewählt, während SENN sie Oicomona-



lucro tambem não basta para estabelecer familia separada. Para a nossa primeira familia reestabelecemos o velho nome *Cercomonadaceae*, emquanto SENN a denominou *Oicomonadaceae*, tendo eliminado o genero *Cercomonas*. SENN colocou tambem aqui os generos *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Trypanosoma* os quais, segundo HARTMANN (veja paj. 119) formam uma ordem separada. SENN colocou tambem o genero *Oxyrrhis* nas bodonaceas, mas este, como mostra o trabalho de KEYSSELITZ, tem um nu-

daceen nannte, weil er ja die Gattung *Cercomonas* gestrichen hatte. SENN hat hier auch die Gattungen *Leptomonas*, *Herpetomonas* und *Trypanosoma* untergebracht, die jedoch nach HARTMANN eine eigene Ordnung bilden. (Näheres darüber siehe später Seite 119) Bei den Bodonaceen wird von SENN auch die Gattung *Oxyrrhis* eingereiht. Wie die Arbeit von KEYSSELITZ gezeigt hat, weist diese jedoch einen Kern auf, wie er sich sonst nur bei Euglenoideen und Dinoflagellaten findet. Derselbe stimmt besonders mit dem der Dinoflagellaten

cleo como só é observado nas euglenoideas e nos dinoflajelados. Sobretudo corresponde completamente ao nucleo da dinoflajelada *Gymnodinium*, segundo os trabalhos inéditos de JOLLOS do « *Institut für Infectionskrankheiten* ». Junta-se a isto o modo de multiplicação por cizão transversal completamente diverso do dos euflajelados e que tambem só se encontra nos dinoflajelados. Julgamos, por isso, que esta forma deve ser colocada entre os dinoflajelados.

O genero *Cyathomonas*, pelo contrario, não obstante a sua semelhança na estrutura celular, não é uma criptomonada, como pensam BUETSCHLI, BLOCHMANN e v. PROWAZEK, mas protomonadina tipica, devendo ser colocada na familia das anfimonadaceas, como já foi exposto na parte especial (paj. 88).

Os tripanozômos e os generos aliados (*Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Trypanoplasma* etc.) reprezentam o terceiro tipo da inserção flajelar onde ha um nucleo locomotor separado ao qual se liga por meio de um rizoplasto uma granulação bazal de que nacem os flajelos. Por cauza deste nucleo locomotor separado, já, em 1907, HARTMANN os tirou da ordem das protomonadinas, formando uma ordem especial, os *binucleados*, na qual entram tambem os hemosporidios. Contra esta modificação DOFLEIN objetou que, de um lado a natureza nuclear do blefaroplasto não era demonstrada e este, de outro lado não se limitava aos tripanozômos. Ambas estas objeções não procedem. Já depois dos estudos fundamentais de SCHAUDINN e v. PROWAZEK não podiam subzistir duvidas sobre a natureza nuclear do blefaroplasto, e pelas observações citolojicas exatas de ROSENBUSCH e CHAGAS e as observações acima expostas na *Prowazekia* esta se acha completamente confirmada. De outro lado, as nossas verificações acima publicadas mostram que nenhum outro grupo de flajelados e principal-

Gymnodinium nach unveröffentlichten Untersuchungen von JOLLOS aus dem Institut für Infektionskrankheiten vollständig überein. Dazu kommt noch die von den Euflagellaten ganz abweichende Art der Vermehrung durch Querteilung, die sie ebenfalls nur mit den Dinoflagellaten teilt. Wir glauben daher, dass diese Form bei den Dinoflagellaten untergebracht werden muss.

Dagegen ist die Gattung *Cyathomonas* trotz ihrer Aehnlichkeit im Zellbau nicht, wie BÜTSCHLI, BLOCHMANN und v. PROWAZEK annehmen, eine Cryptomonade, sondern eine typische Protomonadine, und ist als solche in die Familie der Amphimonadaceen zu stellen, wie schon im speziellen Teil, Seite 88, ausgeführte wurde.

Die Trypanosomen und ihre Verwandten (*Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Trypanoplasma* etc.) repräsentieren den *dritten* Typ der Geisselinsertion, in dem ein besonderer lokomotorischer Kern vorhanden ist, mit dem durch einen Rhizoplasten ein Basalkorn verbunden ist, von dem die Geisseln entspringen. Auf Grund ihres besonderen lokomotorischen Kernes hat HARTMANN (1907) sie schon aus der Ordnung der Protomonadinen entfernt und zusammen mit den sogenannten Hämosporidien eine besondere Ordnung, die *Binucleaten*, errichtet. Gegen diese Aenderung hat DOFLEIN den Einwand erhoben, dass einmal die Kernnatur des Blepharoplasten noch nicht erwiesen sei, andererseits ein Blepharoplast nicht nur den Trypanosomen zukomme. Beide Einwände treffen nicht zu. Schon nach den grundlegenden Untersuchungen von SCHAUDINN und v. PROWAZEK konnte an der Kernnatur des Blepharoplasten kaum Zweifel bestehen, und nach den exakten cytologischen Befunden von ROSENBUSCH und CHAGAS, sowie den hier mitgeteilten Beobachtungen an *Prowazekia*, ist dieselbe vollkommen sichergestellt. Andererseits zeigen unsere hier mitgeteilten Untersuchungen, dass bei keiner anderen Flagellatengruppe, vor allem bei keiner Gattung der Protomonadinen, ein besonderer lokomotorischer Kern neben dem

mente nenhum genero de protomonadinas possue um nucleo locomotor separado ao lado do corpusculo bazal. A unica forma na qual encontrámos este acidente, a *Prowazekia cruzi*, por isso mesmo não é uma protomonadina, mas uma forma primitiva de binucleado, da qual, como já expuzemos, se pode derivar diretamente o genero parazitario *Trypanoplasma*. Talvez algum dia se encontre um flajelado do tipo da *Oicomonas* com nucleo locomotor separado que, então, de modo analogo, poderia ser considerado forma primitiva dos binucleados uniflajelados. Sobre os pormenores da justificação da ordem dos binucleados e sua subdivizão em familias veja-se um trabalho de Hartmann e Jollos que já se acha no prelo.

A respeito da quarta ordem dos flajelados, as *Chromomonadinae* (Blochmann) não ha estudos citolojicos suficientes para tirar concluzões sobre a sua pozição no sistema e a sua sub-divizão. Assim mesmo, já foram divididas por Senn em trez ordens separadas, as *Chrysomonadina*, *Chloromonadina* e *Cryptomonadina*. Tambem, já parece bastante certo que os dous ultimos grupos poucas relações naturais têm com o primeiro, porque a criptomonadina *Chilomonas*, entre as *Chromomonadinae* a unica forma bem estudada, tem a inserção flajelar do terceiro tipo e assim se aproxima das euglenas. Aproxima-se destas, tambem, pela estrutura nuclear e poder-se-ia mesmo falar de uma especie de pozição intermediaria entre as protomonadinas superiores (*Cyathomonas*), existindo já um nucleo exterior permanente. Esta estrutura nucleoflajelar justifica a questão si não seria mais correto remover as *Cryptomonadinae* das *Chromomonadinae*, colocando-as junto ás euglenoideas. Se, contra isso parece falar a diferenciação diversa dos cromatoforos, para nós não tem muita importancia, visto que tambem nos grupos das algas se acham reunidas formas com cromatoforos diferentes. Todavia, na

Basalkorn vorhanden ist. Die einzige Form, bei der wir das fanden, die *Prowazekia cruzi* ist eben deshalb keine Protomonadine, sondern eine Stammform der Binucleaten. Von ihr kann, wie schon oben ausgeführt, direkt die parasitische Gattung *Trypanoplasma* abgeleitet werden. Vielleicht trifft man auch einmal ein *Oicomonas*artiges Flagellat mit besonderem lokomotorischen Kern, das dann in ähnlicher Weise als Stammform der eingeisseligen Binucleaten angesehen werden könnte. Bezüglich näherer Ausführung über die Begründung der Binucleaten und ihrer Einteilung in Familien sei auf die im Druck befindliche Arbeit von Hartmann und Jollos (1910) verwiesen.

Ueber die vierte Ordnung der Flagellaten, die *Chromomonadina* (Blochmann), liegen noch keine genügenden cytologischen Befunde vor, um bezüglich ihrer systematischen Stellung resp. Aufteilung Schlüsse ziehen zu können. Senn hat sie zwar schon in drei besondere Ordnungen aufgelöst, nämlich die *Chrysomonadina*, *Chloromonadina* und *Cryptomonadina*. Ziemlich sicher erscheint auch, dass die beiden letzteren Gruppen mit der ersteren wenig natürlichen Zusammenhang aufweisen, denn die Cryptomonadine *Chilomonas*, die einzig untersuchte Form der Chromomonadinen weist in ihrer Geisselinsertion den dritten Typ auf und stimmt somit hierin mit den Euglenen überein. Auch im Kernbau findet sich eine Annäherung an die Euglenen, ja, man könnte eventl. von einer Art Mittelstellung zwischen hochentwickelten Protomonadinen (*Cyathomonas*) und Euglenen reden, indem schon ein dauernder generativer Aussenkern vorhanden ist. Dieser Kern- und Geisselbau legt somit die Frage nahe, ob nicht mit grösserem Recht die Cryptomonadinen von den Chromomonadinen entfernt und zu den Euglenoideen gestellt würden. Dagegen spricht allerdings die verschiedene Art in der Ausbildung der Chromatophoren; doch fällt das unserer Meinung nach nicht so schwer ins Gewicht, da ja auch bei manchen Algengruppen Formen mit verschiedenen Chromatophoren

falta de outras criptomonadinas e principalmente de crizomonadinas com a citolojia bem examinada parece melhor deixar esta questão para mais tarde e conservar, provizoriamente, a ordem das cromomonadinas, no sentido de BLOCHMANN.

Como já expuzemos, a ordem das euglenoideas concorda com *Chilomonas* na estrutura nucleoflajelar, mostrando, assim, o *quarto* grupo de inserção flajelar. Alem disso, todas as euglenoideas, mesmo as formas mais simples como *Copromonas* (DOBELL, BERLINER), têm sempre um nucleo exterior generativo do qual, na mitoze das formas superiores, se formam cromozomios evidentes. A ordem das euglenoideas, estabelecida por KLEBS, fundado em condições exteriores de organização, assim tambem em relação á citolojia fórma um grupo natural. Estudos posteriores mostrarão até que ponto a subdivizão em subordens e familias preciza ser reformada, em vista das relações dos flajelos, que foram apenas mencionadas na parte geral.

A ultima ordem, as *Phytomonadinae*, é tão bem fundada e as relações de afinidade nella são tão claras que parece superfluo entrar neste assunto. Nellas a inserção flajelar não difere da das protomonadinas como mostram as observações de DANGEARD, MAIER e v. PROWAZEK para *Polytoma*, e de DANGEARD e MAIER para as *Chlamydomonadae*. O aparelho nuclear exterior contem substancia generativa, mas na mitoze os cromozomios são formados, tanto por estes, como pelos cariozomas. Como já mostrámos, tal estrutura nuclear facilmente se deriva das condições observadas nas protomonadinas superiores, por exemplo de *Cyathomonas*. Parece bastante certo que as fitomonadinas descenderam diretamente das anfimonadinas.

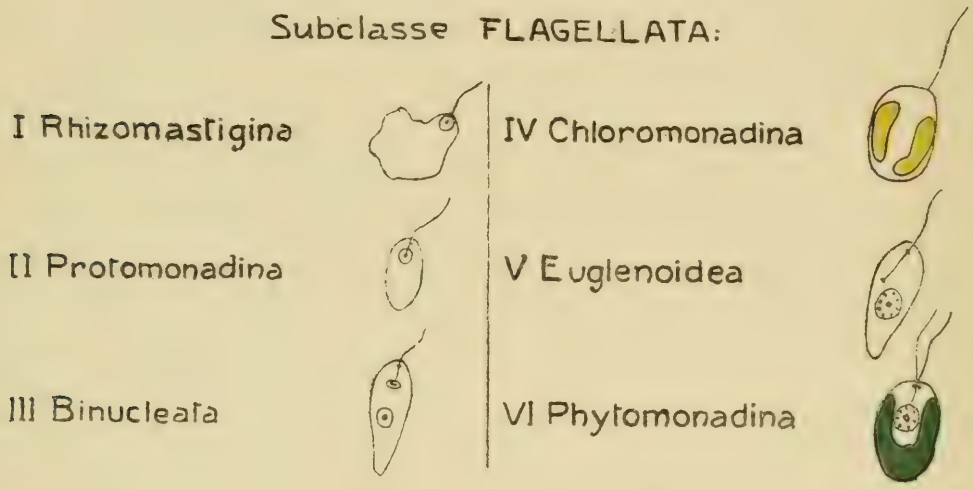
vereinigt sich finden. Da jedoch noch keine weiteren Cryptomonadinen, vor allem aber auch überhaupt keine Chrysomonadinen cytologisch untersucht sind, so ist es am besten in dieser Frage eine abwartende Stellung einzunehmen und provisorisch die Ordnung der Chromomonadinen in dem BLOCHMANN'schen Sinne beizubehalten.

Wie schon erwähnt, stimmt im Bau des Geisselapparats die Ordnung der Euglenoidea mit *Chilomonas* überein, zeigt also unseren vierten Typus der Geisselinsertion. Alle Euglenoideen, selbst die einfachsten Formen, wie *Copromonas* (DOBELL, BERLINER), haben weiterhin stets einen generativen Aussenkern, aus dem bei den höheren Formen bei der Mitose deutliche Chromosomen gebildet werden (*Peranema*). Die Ordnung der Euglenoideen, wie sie KLEBS auf Grund der äusseren Organisationsverhältnisse aufgestellt hat, ist mithin auch auf cytologischer Basis eine natürliche Gruppe. Inwieweit eine Revision der Einteilung in Unterordnungen und Familien eventuell auf Grund der im speziellen Teil gestreiften Geisselverhältnisse notwendig ist, müssen weitere Untersuchungen lehren.

Die letzte Ordnung, die *Phytomonadinen*, ist so wohl fundiert und die verwandtschaftlichen Verhältnisse in ihr liegen so klar zu Tage, dass ein weiteres Eingehen überflüssig erscheint. Bezüglich der Geisselinsertion verhalten sie sich ganz wie die Protomonadinen, wie die Beobachtungen von DANGEARD, MAIER und v. PROWAZEK für *Polytoma*, von DANGEARD und MAIER für *Chlamydomonaden* zeigen. Im Kernapparat finden wir den oben geschilderten dritten Typus, d. h. auch der Aussenkern enthält stets generatives Material, doch werden die Chromosomen bei der Mitose von diesen wie von dem Caryosom gemeinsam gebildet. Wie oben gezeigt, lässt sich ein solcher Kernbau leicht von den Verhältnissen bei höheren Protomonadien z. B. *Cyathomonas* ableiten. Man wird wohl nicht fehlgehen, wenn man annimmt, dass die Phytomonadinen direkt von Amphimonadinen sich entwickelt haben.

Assim, teriamos na subclasse dos euflajelados em sentido estrito, seis ordens distintas das quais uma, a das protomonadinas, deve ser considerada provizoria. A tabela abaixo dá pelas figuras esquematicas apostas uma caraterização breve das mesmas :

Wir hätten demnach in der Subklasse der *Euflagellaten* oder *Flagellaten* im engeren Sinne sechs Ordnungen zu unterscheiden, von denen die eine, die Chloromonadinen, als provisorische anzusehen ist. Folgende Tabelle gibt durch beigefügte Schemata eine kurze Charakteristik derselben :



BIBLIOGRAFIA.

Aragão (H. de Beaurepaire) 1909 Sobre a *Amoeba diplomitotica* n. sp.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Tomo I, p. 33.

Bensen (W.) . . . . 1909 Bau und Arten der Gattung Lamblia.
Zeitsch. f. Hyg. u. Infektionskrank. Bd. 61, p. 109—144. 6 Fig.

Bensen (W.) . . . . 1909 Untersuchungen über *Trichomonas intestinalis* und *vaginalis* des Menschen.
Archiv f. Protistenk. Bd. 18, p. 115.

Berliner (Ernst) . . 1909 Flagellaten-Studien.
Archiv f. Protistenk. Bd. 18, p. 115.

Buetschli (O.) . . 1883-87 Protozoa.
In Bronn's Kl. u. Ordn. des Thier-Reichs. Vol. 1. Abt. I—II—III.

Chagas (Carlos) . . . 1909 Nova tripanozomiaze humana.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Tomo I, p. 159.

Dallinger (W. H.) et Drysdale (J.) . . 1873 Researches on the life history of a Cercomonad, a Lesson in Biogenesis.
Monthl. micr. Journal. Vol. X., p. 53—58.

Dobell (C. C.) . . .	1908	Research on the intestinal Protozoa of frogs and toads. The Quarterly Journal of Microscop. Science. Vol. 53, part 2. January.
Fisch (C.)	1885	Unters. über einige Flagell. u. verwandte Organ. Zeitsch. f. wiss. Zoolog. Vol. 42, p. 47.
Hartmann (Max) . . .	1907	Das System der Protozoen. Archiv f. Protistenk. Bd. 10, p. 139.
Hartmann (Max) . . .	1908	Eine neue Dysenterieamoebe. Archiv f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. 12. Beiheft 5.
Hartmann (Max) und Hammer (Ernst) . .	1909	Untersuchungen über die Fortpflanzung von Radiolarien. Sitzungsberichten der Gesellschaft Naturforschender Freunde. N. 4.
Hartmann (Max) und Prowazek (S. von)	1907	Blepharoplast, Caryosom und Centrosom. Archiv f. Protistenk. Bd. 10, p. 306.
Keysselitz (G.) . . .	1908	Die Entwicklung von Myxobolus pfeifferi. Archiv f. Protistenk. Bd. 11, p. 252—276.
Keysselitz (G.) . . .	1908	Studien über Protozoen. Archiv f. Protistenk. Bd. 11, p. 334.
Koltzoff (N. K.) . .	1906	Studien über die Gestalt der Zelle. Archiv f. Mikr. Anat. V. 67, p. 364.
Moroff (Theodor) . .	1904	Beitrag zur Kenntnis einiger Flagellaten. Archiv f. Protistenk. Vol. 3, p. 69.
Naegler (R.)	1909	Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amoeben. Archiv f. Protistenk. Bd. 15.
Prowazek (S. von) . .	1902	Notiz ueber die *Trichomonas hominis*. Archiv f. Protistenk. Bd. I, p. 167.
Prowazek (S. von) . .	1903	Flagellaten-Studien. Archiv f. Protistenk. Bd. II, p. 195.
Prowazek (S. von) . .	1904	Unters. über einige parasit. Flagellaten. In Arb. a. d. Kais. Ges. Amt. Vol. 21, p. 1.
Prowazek (S. von) . .	1905	Studien über Saeugetiertryponosomen. Arb. a. d. Kais. Ges. Amt. Bd. XXII.
Prowazek (S. von) . .	1907	Bemerkung zu dem Aufsatz « Beiträge zur Kenntnis der Flagellaten » von Awerinzew, Zool. Anzeiger. Bd. XXXI. N. 25. Zool. Anz. Bd. XXXII, p. 380—381, 3 Fig.
Prowazek (S. von) . .	1908	Untersuchungen über einige parasitische Flagellaten. Arbeiten aus dem Kaiserl. Ges. Amt. Bd. 21, p. 1.
Rosenbusch (T.) . . .	1908	Trypanosomen-Studien. Archiv f. Protistenk. Bd. 15, p. 263.
Schaudinn (Fr.) . . .	1896	Ueber das Centralkorn der Heliozoen. Verh. d. deutsch. Zool. Ges.
Schaudinn (Fr.) . . .	1904	Generations- u. Wirtswechsel bei Trypanosoma und Spirochaete. Arb. a. d. Kais. Ges. Amt. Vol. 20, p. 387.
Senn (F.)	1900	Flagellaten. In : Engler u. Prantl, Natürliche Pflanzenfamilie. Vol. I. Abt. la. p. 93.
Vahlkampf (E.) . . .	1905	Beiträge z. Behandlung u. Entwicklungsgeschichte von *Amoeba limax*. Archiv f. Protistenk. Vol. 5.
Wenyon (C. M.) . . .	1907	Observations on the protozoa in the intestine of Mice. In Archiv f. Protistenk. Suppl. Vol. I, p. 193.
Zuelzer (Margarete) .	1909	Bau und Entwicklung von *Wagnerella borealis* Mereschk . Archiv f. Protistenk. Bd. 17, p. 135.

ESPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS.

Todas as figuras das estampas 4 a 9 (com exceção das Fig. 1 e 2, dezenhadas do vivo) foram tiradas de preparações feitas em laminulas e fixadas em estado humido com mistura de sublimado e alcool, segundo SCHAUDINN ou com liquido de HERMANN e coloridas com hematoxilina férrea, segundo HEIDENHAIN (ou ROSENBUSCH Fig. 4). As Fig. 1—17, 20 e 22—82 nas Estampas 4—8 e Fig. 90 na Estampa 9 são reproduzidas em aumento de 3.700 vezes (Zeiss. Apocr. Obj. 2mm. e Oc. Comp. 18 na altura da meza e com aparelho para dezenhar de Abbe), as Fig. 83—89 a 91 na Estampa 9 com aumento de cerca de 2.700 (Zeiss. Apocr. Obj. 2mm. e Oc. Comp. 12), as Fig. 18, 19 e 27 na Estampa 5 com aumento aproximativo de 1.600 vezes (Z. A. Obj. 2mm. e Oc. Comp. 8).

ESTAMPA 4.

Fig. 1—13 *Cercomonas parva* n. sp.
» 1—2 O mesmo individuo vivo em duas fazes de movimento diferentes.
» 3—7 Formas vejetativas; na Fig. 4 com bastonete axial distinto.
» 5 Principio de divizão nuclear, divizão de centriolo.
» 6—10 Estádios de divizão nuclear.
» 12 Cistos de rezistencia.
» 13 Começo de encistamento e formação do novo corpusculo bazal.
» 14 *Cercobodo* (*Dimastigamoeba*) sp.?
» 15 *Oicomonas* spec.?
» 16 *Monosiga* spec.?
» 17 *Monas* spec.?

ESTAMPAS 5 E 6.

SPONGOMONAS SPLENDIDA

(Fig. 18 e 22—25).

SPONGOMONAS UVELLA

(Fig. 20, 21 e 26—45).

Fig. 18 Pequena colonia de *Spongomonas splendida.*
» 19 Idem de *sp. uvella.*
» 20 Dois individuos da mesma, com a substancia gelatinoza, em aumento maior.
» 21 Grupo de formas ameboides de *Sp. uvella.*
» 22—25 Divizão nuclear e formação flajelar de *Sp. splendida.*
» 26—30 Formas vejetativas de *Sp. uvella.*
» 31—33 Divizão do centriolo nas profazes da mitoze.
» 34—43 Estádios de divizão nuclear.
» 44 Formação de corpusculos bazais e flajelos.
» 45 Divizão celular.

TAFELERKLÄRUNG.

Sämmtliche Figuren der Tafeln mit Ausnahme von Fig. 1 u. 2, die nach dem Leben gezeichnet sind, wurden nach Deckglaspräparaten entworfen, die feucht mit Subl. Alk. nach SCHAUDINN oder HERMANN'scher Flüssigkeit fixiert und mit Eisen-Hämatoxylin nach HEIDENHAIN (oder ROSENBUSCH, Fig. 4) gefärbt waren. Die Fig. 1—17, 20 u. 22—82 auf den Tafeln 4—8 u. Fig. 90 auf Taf. 9 sind bei c. 3700facher Vergrösserung wiedergegeben (Zeiss Apochr. Obj. 2mm. u. Comp. Oc. 18 in der Höhe des Arbeitstisches mit dem ABBE'schen Zeichenapparat), die Fig. 83—89 u. 91 auf Tafel 9 bei c. 2700facher Vergr. (Zeiss Apochr. Obj. 2mm und Comp. Oc. 12), die Fig. 18, 19 u. 27 auf Tafel 5 bei c. 1600facher Vergr. (Z. A. Obj. 2mm. und Comp. Oc. 8).

TAFEL 4.

Fig. 1—13 *Cercomonas parva* n. sp.
Fig. 1—2 Dasselbe Individuum in 2 verschiedenen Bewegungsphasen nach dem Leben.
Fig. 3—7 Vegetative Formen, in Fig. 4 mit deutlichem Axenstab.
Fig. 5 Beginn der Kernteilung, Centriolteilung.
Fig. 6—10 Stadien der Kernteilung.
Fig. 12 Dauercyste.
Fig. 13 Beginn der Excystierung und Bildung des neuen Basalkörpers.
Fig. 14 *Cercobodo* (*Dimastigamoeba*) sp.?
Fig. 15 *Oicomonas* spec.?
Fig. 16 *Monosiga* spec.?
Fig. 17 *Monas* spec.?

TAFEL 5 E 6

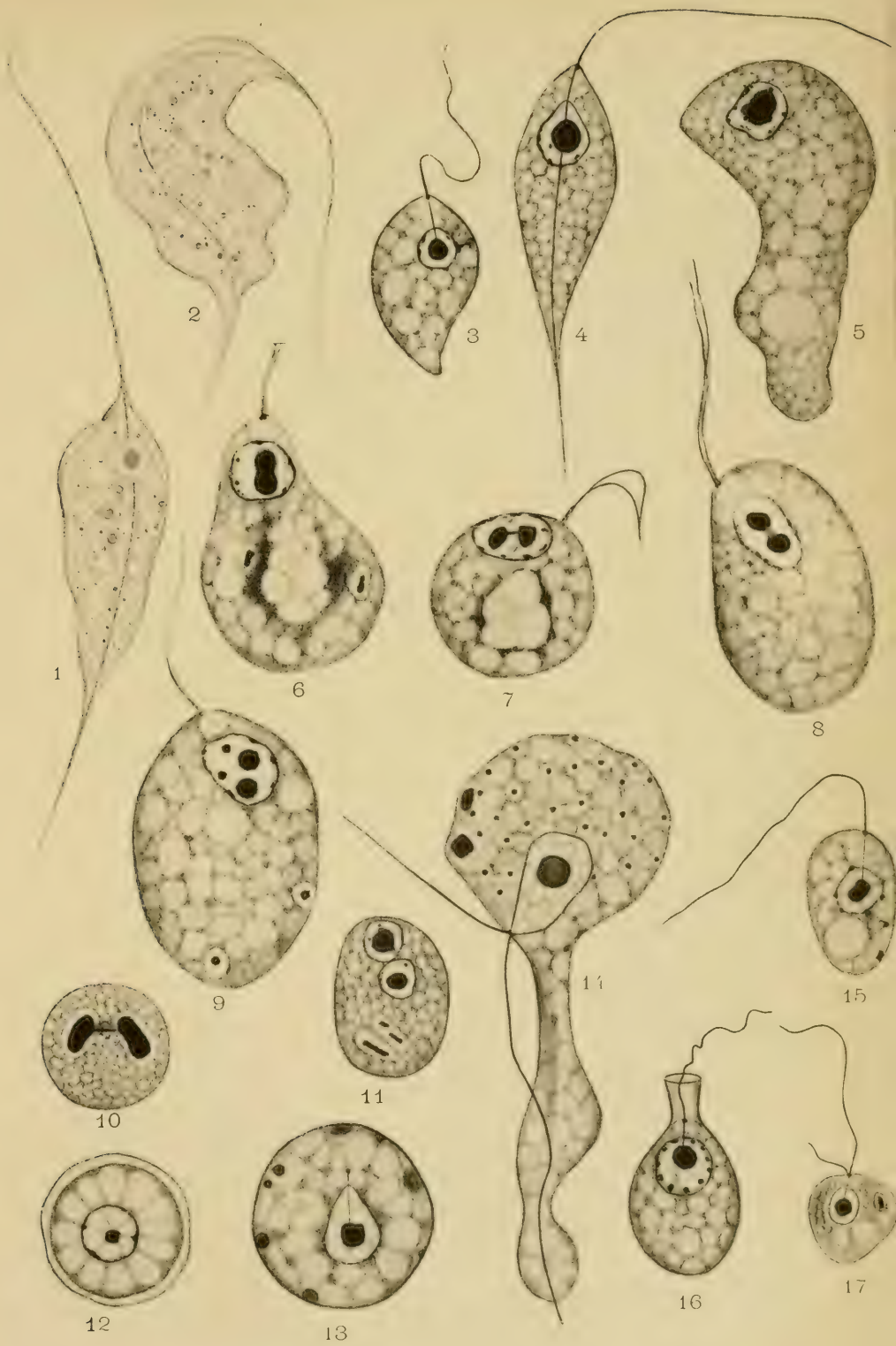
SPONGOMONAS SPLENDIDA

Fig. 18 und 22—25.

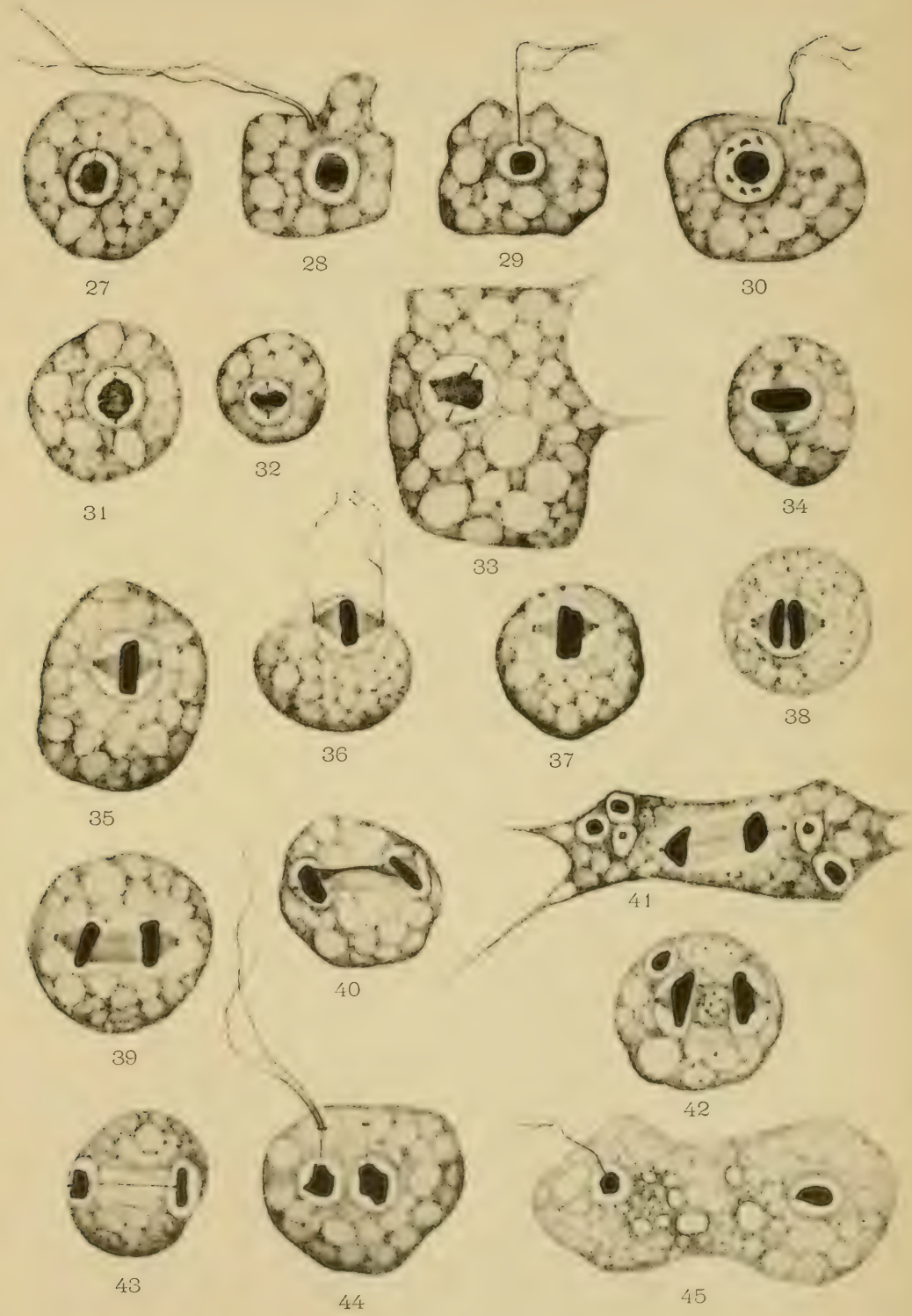
SPONGOMONAS UVELLA

Fig. 20, 21 und 26—45.

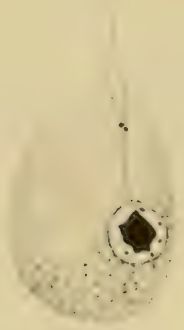
Fig. 18 Kleine Kolonie von *Spongomonas splendida.*
Fig. 19 Dasgl. von *Spongomonas uvella.*
Fig. 20 Zwei Individuen derselben mit umgebender Gallerte, stärker vergrössert.
Fig. 21 Gruppe von amoeboiden Formen von *Sp. uvella.*
Fig. 22—25 Kernteilung und Geisselbildung von *Sp. splendida.*
Fig. 26—30 Vegetative Formen von *Sp. uvella.*
Fig. 31—33 Centriolteilung in den Prophasen der Mitose.
Fig. 34—43 Stadien der Kernteilung.
Fig. 44 Bildung von Basalkörpern und Geissel.
Fig. 45 Zellteilung.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
11
12
13
15
16
17

18
19
20
21
22
23
24
25
26


27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

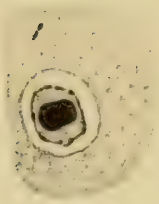
46



47

48

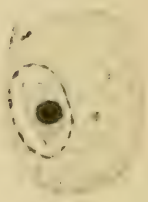
49



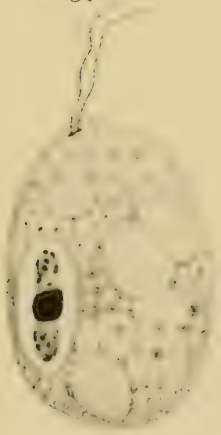
50

51

52



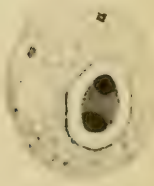
53



54

55

56



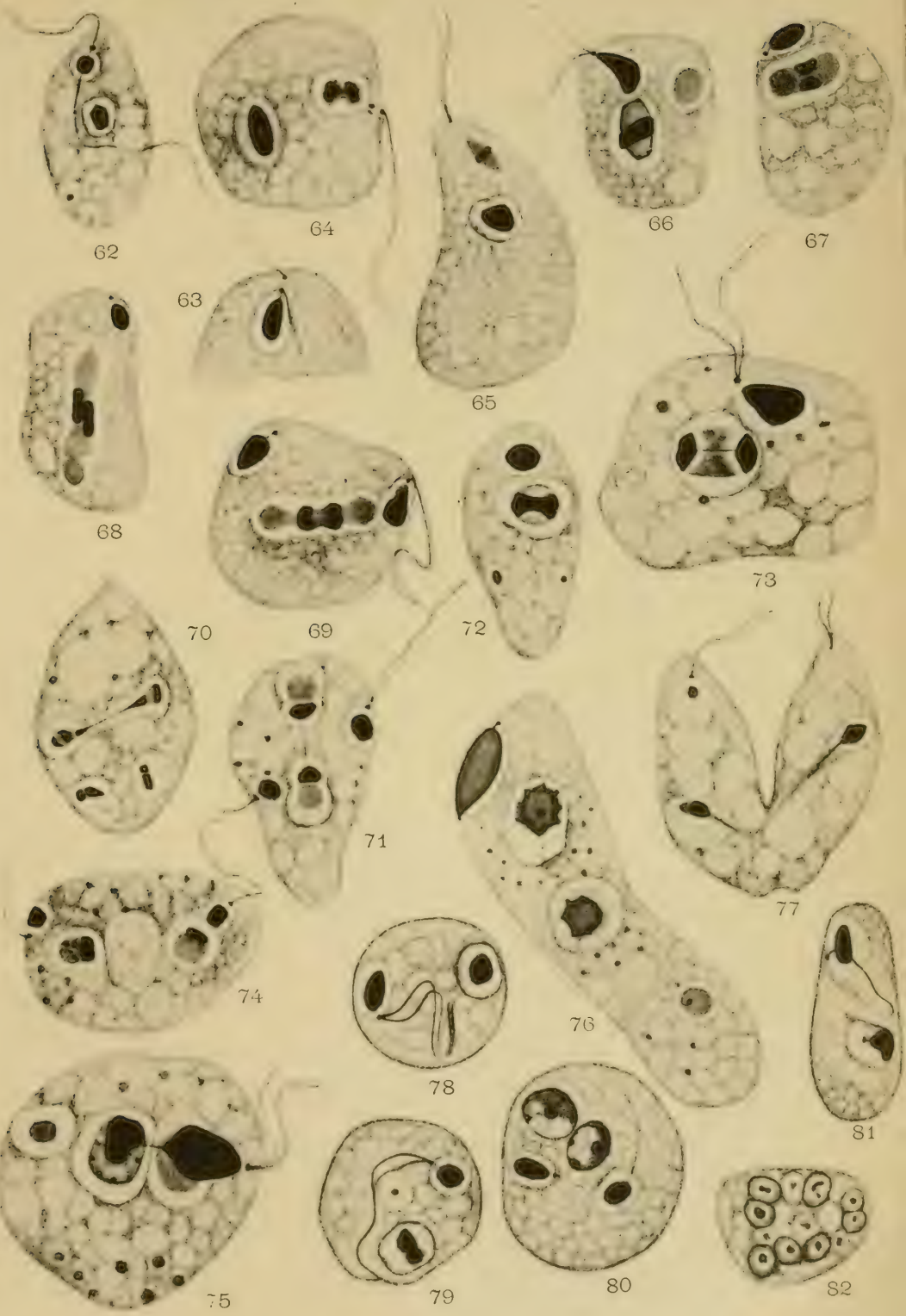
57

58

59

60

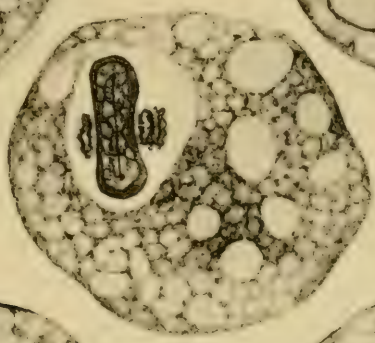
61



CASTRO SILVA DEL.

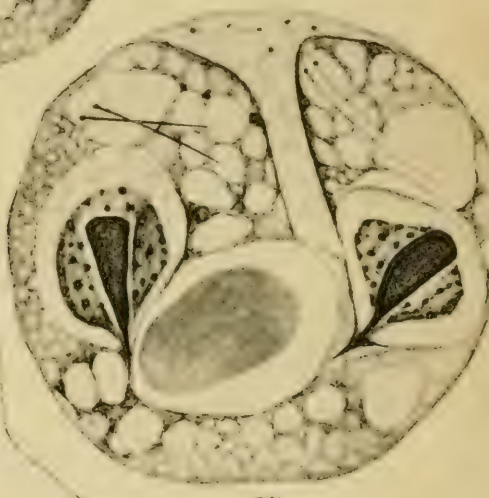
83

85



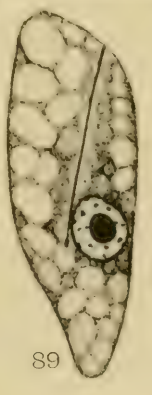
84

86

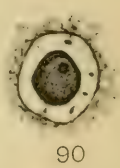


87

88



89



90

91

ESTAMPA 7.

CYATHOMONAS TRUNCATA.

Fig. 46—47 Formas vejetativas.
» 48 Formas vejetativas em perfil visto do lado mais curto.
» 49—52 Fórmas vejetativas, mostrando as variações ciclicas do cariozoma.
» 53—59 Fazes da divizão nuclear.
» 60 Reconstrução dos nucleos filhos.
» 61 Divizão celular e neojeneze dos rizoplastos.

ESTAMPA 8.

PROWAZEKIA CRUZI.

» 62—63 Formas vejetativas.
» 64—65 Divizão do nucleo flajelar.
» 66—71 Divizão normal do nucleo principal.
» 72—73 Divizão abreviada do nucleo principal.
» 74—76 Reconstrução dos nucleos filhos.
» 77 Divizão celular.
» 78—81 Cistos de rezistencia; na Fig. 79 começo de divizão do nucleo principal, em 80 com 2 nucleos principais e 2 flajelares.
» 82 Esquizogonia (?)

ESTAMPA 9.

PERANEMA TRICHOPHORUM
(Fig. 83—88)
e
CHILOMONAS PARAMAECIUM
(Fig. 89—91).

» 83 Forma vejetativa de *Peranema*.
« 84—87 Divizão nuclear e neojeneze dos flajelos.
» 88 Divizão celular.
» 89 Formas vejetativas de *Chilomonas*.
» 90 Nucleo com centriolo (aumento maior).
» 91 Começo da divizão nuclear.

TAFEL 7.

CYATHOMONAS TRUNCATA.

Fig. 46—47 Vegetative Formen.
Fig. 48 Vegetative Form von der Kante der kürzeren Seite.
Fig. 49—52 Vegetative Formen, zyklische Veränderungen am Caryosom zeigend.
Fig. 53—59 Stadien der Kernteilung.
Fig. 60 Rekonstruktion der Tochterkerne.
Fig. 61 Zellteilung und Neubildung der Rhizoplaste.

TAFEL 8.

PROWAZEKIA CRUZI.

Fig. 62—63 Vegetative Formen.
Fig. 64—65 Teilung des Geisselkernes.
Fig. 66—71 Reguläre Teilung des Hauptkernes.
Fig. 72—73 Abgekürzte Teilung des Hauptkernes.
Fig. 74—76 Rekonstruktion der Tochterkerne.
Fig. 77 Zellteilung.
Fig. 78—81 Dauercysten; bei Fig. 79 beginnende Teilung des Hauptkerns, bei 80 mit 2 Hauptkernen und 2 Geisselkernen.
Fig. 82 Schizogonie (?).

TAFEL 9.

PERANEMA TRICHOPHORUM
(Fig. 83—88)
und
CHILOMONAS PARAMAECIUM
(Fig. 89—91).

Fig. 83 Vegetative Form von *Peranema*.
Fig. 84—87 Kernteilung und Neubildung der Geisseln.
Fig. 88 Zellteilung.
Fig. 89 Vegetative Form von *Chilomonas*.
Fig. 90 Kern mit Centriol (stärker vergrössert).
Fig. 91 Beginn der Kernteilung.

Estudo quantitativo sobre a germinação dos esporos

PELO

Dr. A. Godoy,

Assistente.

Ueber die Keimung der Sporen

VON

Dr. A. Godoy,

Assistenten.

Já haviamos iniciado o estudo da germinação dos esporos do *bacillus anthracis* em sua relação com o tempo, considerando a termo-estabilidade como indice da sua integridade, quando apareceu o trabalho de FISCHOEDER (1909).

O que se encontra na literatura deste assunto é por demais esquematico. Atribue-se a cada temperatura determinado espaço de tempo para dezenvolvimento do bacilo. As nossas experiencias não estão de acordo com esta prezunção e, dentro de certos limites de temperatura e de tempo, se obteria nas temperaturas baixas a transformação de um certo numero de esporos no espaço de tempo que se atribue a uma mais alta, assim, como, em temperatura mais alta muitos esporos deixariam de germinar dentro do lapso de tempo em que a maioria já houvesse germinado em temperatura inferior.

Als die Arbeit von FISCHOEDER (1909) erschien, hatte ich bereits das Studium der Sporenkeimung des Milzbrandbacillus in ihrem Verhältnisse zur Zeit begonnen, wobei ich die Thermostabilität als Controlle für noch nicht eingetretene Keimung gebrauchte.

Was man in der Litteratur über diesen Gegenstand antrifft, ist allzu schematisch, indem man für jede Temperatur eine bestimmte Zeit zur Entwicklung des Bacillus aufstellt. Meine Versuche stimmen mit dieser Voraussetzung nicht überein; innerhalb gewisser Zeit- und Temperaturgrenzen könnte man die Umwandlung einer gewissen Anzahl von Sporen in einer Frist erhalten, welch einer höheren Temperatur zugeschrieben wird, während dagegen bei einer höheren Temperatur viele Sporen in einem Zeitraum, in welchem bei niedrigerer Temperatur die Mehrzahl der Sporen schon gekeimt hätte, noch nicht zur Keimung schreiten. Bei mikroskopischer Beobachtung

O tempo de vejetação de um esporo, observado microscopicamente, depende da cazualidade da escolha.

A perda da termo-rezistencia dos esporos em tempo muito curto, quando transportados para um meio nutritivo foi vulgarizada por Weil, (1901), que observou que semeando 8.600 esporos, já no fim de 10 minutos só se encontravam algumas dezenas de fórmas que rezistiam ao aquecimento. Porem, a este respeito sobresai em importancia o trabalho de Fischoeder recentemente aparecido em que é isto demonstrado á saciedade. Os esporos quando colocados em liquidos nutritivos e mesmo em agua fiziolojica perdem em curto tempo a rezistencia ao calor.

Os estudos já feitos não sendo suficientemente exatos não permitem conhecer a sequencia ou lei que reje a germinação. Não se póde com os rezultados obtidos, tratados pelo calculo chegar ao conhecimento do processo, quer em relação á sua interpretação, quer no que respeita á sua reprezentação matematica.

Preferimos de muito a perda da termo-estabilidade como indice da transformação dos esporos aos outros, tais como a dificuldade da coloração, de descoramento, o aparecimento de nova celula orijinaria do esporo, etc.

Tecnica. — De uma cultura esporulada de carbunculo faziamos emulsão em agua fiziolojica-glicerinada (1 parte de agua fiziolojica para 2 de glicerina). A emulsão era ajitada e filtrada atravez de papel de filtro de modo a serem eliminados os grumos. Tinhamos assim uma emulsão concentrada. Desta faziamos novamente outras diluições no mesmo liquido e por meio de contajens em placas semeadas com quantidade

hängt die Vegetationszeit einer Spore vom Zufalle der Auswahl ab.

Der Verlust der Thermoresistenz der Sporen kurze Zeit nach der Uebertragung auf einen neuen Nährboden wurde 1901 durch Weil bekannt; derselbe beobachtete, dass schon 10 Minuten nach dem Einsäen von 8600 Sporen, die Zahl der Formen, welche dem Erhitzen widerstanden, nur einige Zehner betrug. Weit wichtiger ist jedoch in dieser Hinsicht die neueste Arbeit von Fischoeder, in welcher dies zur Genüge nachgewiesen ist. Die Sporen verlieren in kurzer Zeit ihre Widerstandsfähigkeit gegen Hitze, wenn sie in eine Nährflüssigkeit oder auch nur in physiologische Lösung gebracht werden.

Da die bisher angewandten Methoden nicht genau genug waren, gestatten sie nicht, die Zeitfolge oder das Gesetz zu erkennen, welche den Vegetationsprocess bestimmen. Wenn man die so gewonnenen Resultate zur Berechnung braucht, gelangt man nicht zur Feststellung des Processes, weder in Hinsicht auf seine Erklärung, noch in Beziehung auf seine mathematische Darstellung.

Zum Nachweis der Umwandlung der Sporen ziehe ich den Verlust der Thermostabilität anderen Anzeichen vor, wie sie durch die Schwierigkeit der Färbung und Entfärbung, sowie durch das Auftreten der neuen aus den Sporen hervorgegangenen Zellen geboten werden.

Technik. — Von einer Milzbrandkultur mit ausgebildeten Sporen machte ich eine Emulsion in einem Teile physiologischer Lösung und zwei Teilen Glycerin. Diese wurde geschüttelt und durch Papier filtriert, so dass alle Flocken zurückgehalten wurden. Ich erhielt so eine konzentrierte Emulsion, von welcher mit derselben Lösung wieder Verdünnungen gemacht wurden, deren Sporengehalt durch Plattenkulturen berechnet wurde. Zum Ver-

conhecida julgavamos do numero de esporos por c. c. A diluição que contivesse cerca de 20.000 esporos por c. c. era a escolhida para o ensaio. O caldo que empregámos para a pesquiza da velocidade de germinação fôra preparado e distribuido em vidros de 10 c. c. que eram fechados á lampada, e continham, pois, todos, os mesmos elementos solidos, liquidos e gazozos em igual concentração.

Depois de semear 10 c. c. deste caldo com 1 c. c. da emulsão glicerinada escolhida, ajitavamos o tubo em que faziamos a mistura e em seguida adicionavamos 1 c. c. a cada tubo de vidro rezistente da serie que previamos fazer. Levavamos ao termostato. Apoz diversos espaços de tempo retiravamos um tubo que era aquecido durante 15 minutos a 65° para eliminar os esporos já transformados. Naturalmente, logo apoz a mistura tratámos tambem 1 c. c. da mistura como os seguintes, isto é, aquecemos e fizemos uma 1.ª e 2.ª placa, como já foi por nós descrito em trabalho anterior (1909); 24 ou 30 horas depois faziamos a contajem. Para maior facilidade de confronto os numeros reais de colonias obtidos foram reduzidos proporcionalmente, fazendo o numero correspondente ao tempo inicial egual a 1000.

Experiencia I

Temperatura 22°.8	N.° inicial de esporos 2485	
Minutos	Numero obs.	Numero calc.
0	1000	1000
40	311	235
70	67	79
100	19	26
130	8	8

K = 0,0157

suche wurde eine Verdünnung ausgewählt, welche etwa 20000 Sporen auf den Kubiccentimeter enthielt. Die Bouillon, welche ich bei der Berechnung der Keimungsgeschwindigkeit benutzte, wurde nach der Herstellung in Gläser von 10 ccm. verteilt; letztere wurden dann zugeschmolzen und enthielten so dieselben festen, flüssigen und gasförmigen Elemente in derselben Koncentration. Nachdem 10 ccm. Bouillon mit einem Ccm. der gewählten Emulsion geimpft waren, wurde das Röhrchen geschüttelt und jedem zur Serie gehörigen Röhrchen aus widerstandsfähigen Glase 1 ccm. zugesetzt; letztere wurden dann in den Thermostaten nach Ostwald gebracht. Nach verschiedenen Zeiträumen entnahm ich ein Röhrchen, welches während 15 Minuten auf 65° erhitzt wurde, um die bereits umgewandelten Sporen zu eliminieren. Natürlich wurde auch gleich nach Herstellung der Mischung 1ccm., wie bei den nachherigen Bestimmungen behandelt, nämlich erhitzt und zu einer ersten und zweiten Platte verwandt, wie schon in einer früheren Arbeit beschrieben wurde (1909). 24—30 Stunden später wurde die Zählung vorgenommen. Zur Erleichterung der Vergleichung wurden die wirklich erhaltenen Werte der Kolonienzahlen entsprechend reduciert, so dass die Zahl, welche der Anfangszeit (0 Minuten) entsprach 1000 betrug.

Versuch I

Temperatur 22°.8	Ursprüngliche Sporenzahl 2485	
Minuten	Gefundene Zahl	Berechnete Zahl
0	1000	1000
40	311	235
70	67	79
100	19	26
130	8	8

K = 0.0157

Experiencia II

Temperatura 28°	N.° inicial de esporos 1622	
Minutos	Numero obs.	Numero calc.
0	1000	1000
8	430	400
15	210	180
25	72	75
35	52	67
	K = 0,05	

Como se póde concluir das experiencias acima o processo é regular e obedece á mesma formula que as reações monomoleculares. Os valores calculados foram obtidos por seu intermedio.

Cotejemos os dois valores de K correspondentes ás temperaturas de 22°,8 e 28°, chegaremos de acordo com a formula VAN T'HOFF

$$\frac{c_1}{c_2} = e^{\frac{\mu}{2}\left(\frac{T_1 - T_0}{T_0\, T_1}\right)}$$

(c_1 e c_2 indicam as velocidades nas temperaturas T_0 e T_1—temperaturas absolutas—e onde R, em calorias, seria egual a 2, μ uma constante) a um valor de μ egual a 19.800. Valor este que aproxima esta reação do grupo das ações hidrolizantes, zimoticas, toxicas etc. Para um intervalo de 10 gráos de temperatura dar-se-ia um aumento da velocidade da reação de cerca de 6 vezes.

Rezulta ainda de nossa pesquiza que se não póde estabelecer um tempo inicial para a germinação dos esporos; o fenomeno se passa como se fosse iniciado num tempo

Versuch II

Temperatur 28°	Ursprüngliche Sporenzahl 1622	
Minuten	Gefundene Zahl	Berechnete Zahl
0	1000	1000
8	430	400
15	210	180
25	72	75
35	52	67
	K = 0.05	

Wie man aus den obigen Experimenten schliessen kann, verläuft der Process regelmässig und gehorcht derselben Formel, wie die monomolekularen Reaktionen. Die berechneten Werte wurden mit derselben gefunden.

Bei Vergleichung der beiden Werte von K entsprechend den Temperaturen von 22.8 und 28.0° erhalten wir in Uebereinstimmung mit der Formel von VAN T'HOFF

$$\frac{c_1}{c_2} = e^{\frac{\mu}{2}\left(\frac{T_1 - T_0}{T_0\, T_1}\right)}$$

(wobei c_1 und c_2 die Reaktionsgeschwindigkeit bei den Temperaturen T_0 und T_1 — absolute Temperaturen—angibt; R in Kalorien = 2, und μ eine Konstante ist) einen Wert von μ = 19800, welcher die Reaktion der Gruppe der hydrolysierenden, zymotischen und dergl. Wirkungen nähert.

Für ein Intervall von 10 Temperaturgraden erhält man eine ca. 6malig Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Aus meiner Untersuchung geht noch hervor, dass man für die Keimung der Sporen keine Anfangszeit aufstellen kann; die Erscheinung verläuft, wie wenn sie in

infinitamente pequeno e correspondesse sua velocidade á constante K = 0.0158 na temperatura de 220.8.

Conhecido pelos trabalhos de MADSEN e MAX NYMAN (1907) a aplicabilidade das referidas formulas á destruição dos esporos tanto pelas altas temperaturas como pelos dezinfetantes, rezulta que se póde julgar a germinação dos esporos como uma destruição, dando-se neste cazo uma transformação da substancia termoestavel sem, porem, aniquilar a vida.

Concluimos dizendo que a germinação é comparavel a um fenomeno de destruição monomolecular e que provavelmente obedece, no que diz respeito á influencia da temperatura, á formula de VAN T'HOFF—ARRHENIUS.

einer unendlich kurzen Zeit begonnen hätte und ihre Geschwindigkeit einer Konstanten K = 0.0158 bei einer Temperatur von 220.8 entspräche.

Da durch die Arbeiten von TH. MADSEN und MAX NYMAN (1907) die Anwendbarkeit der erwähnten Formeln auf die Zerstörung der Sporen sowohl durch hohe Temperaturen, als durch Desinficientien erwiesen ist, folgt, dass man die Keimung der Sporen als eine Zerstörung ansehen kann, indem in diesem Falle eine Zerstörung der thermostabilen Substanz ohne Verlust des Lebens stattfindet.

Ich schliesse mit der Feststellung, dass die Keimung der Sporen sich mit einem monomolecularen Zerstörung vergleichen lässt und in Hinsicht auf den Einfluss der Temperatur wahrscheinlich der Formel von VAN T'HOFF-ARRHENIUS entspricht.

BIBLIOGRAFIA.

WEIL	1901	Archiv f. Hyg., Bd. 36, S. 205.
TH. MADSEN und MAX NYMAN . . .	1907	Oversigt over d. k. danske Vid. Selskabs Forth. N. 3. Apud Communications de l'Institut Sérotherapique de l'Etat Danois. Extraits. Tome II. 1908.
F. FISCHOEDER . . .	1909	Centralblatt f. Bakt. etc. I Abt. Bd. 51, Heft 4.
A. GODOY	1909	Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Tomo I, p. 81

Formação de raça do hematozoario do impaludismo rezistente á quinina

PELO

Dr. Arthur Neiva,

Assistente.

Ueber die Bildung einer chininresistenten Rasse des Malariaparasiten

VON

Dr. Arthur Neiva,

Assistenten am Institute.

Raras vezes terá havido ocazião de se observar cuidadozamente em material humano tão abundante e, em condições correspondentes quazi ás de uma pesquiza de laboratorio, como a que nos levou a fazer esta comunicação. Assim é, que, durante 11 mezes, em localidade eminencialmente palustre ligada por estrada de ferro á cidade do Rio de Janeiro, onde essa molestia raras vezes se manifesta, observámos durante o espaço de 20 mezes a media mensal de 3.000 operarios, que por aí passaram, vindo quazi todos desta cidade e aí permaneceram mais ou menos tempo. Desses individuos, era uma parte submetida obrigatoriamente ao uzo da quinina.

Do que foi observado, e que abaixo descrevemos mais detidamente, reléva o seguinte:

1. *As dozes de quinina e a frequencia da sua administração, que a principio eram suficientes para combater o impaludismo, tornam-se mais tarde insuficientes, de modo a ser indispensavel aumental-as para atinjir o mesmo fim.*

Nur selten bietet sich die Gelegenheit, an einem so reichen Krankenmaterial und unter Bedingungen, welche denjenigen eines Laboratoriumsversuches ähnlich sind, genaue Beobachtungen anzustellen, wie es mir in dem Falle möglich war, welcher der vorliegenden Mitteilung zu Grunde liegt. Es konnte nämlich innerhalb eines Zeitraumes von 20 Monaten an einem ausgesprochenen Malariaheerde, welcher mit Rio de Janeiro, wo die Krankheit nur selten vorkömmt, in Einsenbahnverbindung steht, ein monatlicher Durchschnitt von 3000 Arbeitern beobachtet werden, die sich einige Zeit daselbst aufhielten; sie kamen fast alle von Rio, wo sie kürzere oder längere Zeit gewohnt hatten. Ein Teil dieser Leute wurde einer obligatorischen Chininbehandlung unterworfen.

Aus meinen Beobachtungen, die ich weiter unten genauer beschreibe, lässt sich Folgendes deutlich erkennen:

1. *Die Grösse der Dosen und die Häufigkeit ihrer Darreichung, welche Anfangs zur Bekämpfung der Malaria hinreichten, erwiesen sich später als unzulänglich, so dass zur Erreichung desselben Zweckes eine Erhöhung derselben nötig wurde.*

2. *Os individuos que, graças á quinização regular, permaneciam nessa localidade sem ter um só acesso de impaludismo, contraíam-no ao voltar para a cidade livre da malaria, quando julgavam poder cessar o uzo da quinina. (Entre outros cazos, o nosso).*
3. *As dozes de quinina que a principio eram eficazes como meio terapeutico, tornaram-se incapazes, mais tarde, de produzir o mesmo efeito.*

Em Janeiro de 1907, foram iniciados sob a direção do Dr. Sampaio Corrêa trabalhos em zonas do Estado do Rio de Janeiro denominadas Xerém e Mantiquira, com o fim de utilizar e transportar as aguas dos rios destes nomes, para o abastecimento da cidade do Rio de Janeiro. Estas zonas que distam da cidade 60 qm., são accessiveis em 3 horas de estrada de ferro.

A epoca da exacerbação epidemica começa em Outubro, atinje o auje em Janeiro e Fevereiro, e em Maio está em pleno declinio.

A temperatura de Dezembro a Março é reprezentada por uma media mensal que varia de 23° a 24° C..

Sendo uma localidade essencialmente pantanoza e, não havendo na exploração da Estrada de Ferro, serviço de profilaxia conveniente, os trabalhos anteriormente executados eram interrompidos nos mezes epidemicos, adoecendo de malaria 96 % dos individuos empregados nesse serviço, sendo muito elevada a mortalidade.

Mais tarde, foi então iniciado com intensidade, o serviço da captação das aguas, e o nosso Instituto, encarregado do serviço da campanha antipaludica, tendo sido o Dr. Chagas e nós em Fevereiro de 1907 dezignados para dar começo a esse serviço.

A zona sob nossa fiscalização, era reprezentada por uma faixa de terreno desde

2. *Die Leute, welche in Folge regelmässigen Chiningebrauches an Ort und Stelle frei von Malariaanfällen blieben, bekamen solche nach ihrer Rückkehr in die malariafreie Stadt, wenn sie glaubten, mit dem Chiningebrauche aufhören zu können, wie ich an mir selbst beobachtete.*
3. *Die zu Anfang therapeutisch wirksamen Dosen waren später nicht im Stande, dieselbe Wirkung zu erzielen.*

Im Januar 1907 wurden unter Leitung von Dr. Sampaio Corrêa mit Arbeiten für die Wasserversorgung von Rio de Janeiro begonnen, durch welche das Wasser der Flüsse Xerém und Mantiquira in den gleichnamigen Zonen des Staates Rio de Janeiro gefasst und hingeleitet wurde. Diese von der Hauptstadt 60 Kilometer entfernten Gegenden sind in dreistündiger Einsenbahnfahrt zu erreichen.

Die Krankheit beginnt im Oktober epidemisch aufzutreten, erreicht ihren Höhepunkt im Januar und Februar und ist im Mai in entschiedener Abnahme begriffen.

Von Dezember bis März beträgt die monatliche Durchschnittstemperatur 23 bis 24°.

Da die Gegend äusserst sumpfig ist und bei den Vorarbeiten für den Eisenbahnbau keine zweckmässige Prophylaxe stattfand, wurde damals die Tätigkeit während der Epidemiemonate eingestellt, indem von den Leuten 96% erkrankten und die Mortalität sehr bedeutend war.

Als später die Arbeiten für die Fassung energisch in Angriff genommen wurden, beauftragte man das Institut mit der Malariabekämpfung, wobei Dr. Chagas und ich mit der Einleitung derselben beauftragt wurden.

Die von mir beaufsichtigte Zone war ein Streifen Landes, der von der Ortschaft Pavuna an die Stadt Rio grenzt, welche sich einerseits nach der Fazenda Galrão

a localidade Pavuna, zona limitrofe com a cidade do Rio de Janeiro, até a fazenda do Galrão por um lado, e, por outro, compreendia os trabalhos de colocação de encanamentos e construção da estrada de ferro, que se efetuavam nos rios Rejistro, João Pinto e Xérem, o que dava a extensão de 70 qm. aproximadamente.

Muitos pontos eram completamente alagados e de tal modo que os operarios, trabalhavam mergulhados na agua até á cintura. A duração do trabalho era no minimo de 11 horas, havendo ainda os serões de 12 horas, divididos em 2 turmas ; geralmente, os operarios executavam o trabalho do dia e mais $^1/_4$ de serão, isto é, um total de 14 horas de trabalho penozissimo.

Os operarios dormiam em ranchos cobertos de sapê sem a menor proteção mecanica, em numero que a principio de 350 apenas, atinjiu a perto de 4.000 operarios em trabalho quotidiano.

Nas condições referidas, só pareceu indicada a profilaxia quinica, contra a qual, porem, findo algum tempo, se rebelaram os trabalhadores, já por natural ignorancia, já por pertencerem á uma classe infima composta de elementos heterojenios, oriundos de todos os paizes, indiciplinados por indole e que só aí se juntaram por falta de trabalho em outra parte.

Como medida de coerção, só era possivel demitir áquelles que se não queriam submetter ás nossas prescrições. A distribuição da quinina era feita por auxiliares de toda a confiança, que observavam cada individuo até a deglutição da doze da quinina, e consequente verificação de que a capsula não tinha sido empalmada, atirada dentro da roupa ou escondida debaixo da lingua, para ser em seguida deitada fóra.

Logo que se observava uma infração, se o operario se obstinava em recuzar a capsula, era o infrator *in-continenti* despedido.

Este trabalho embora penozissimo foi feito com todo o rigor devido á dedicação

erstreckte und andererseits die Arbeiten für die Legung der Leitung und den Bau der Eisenbahn an den Flüsschen Registro, João Pinto und Xerém begleitete, deren Ausdehnung ungefähr 70 Kilometer betrug.

Viele Strecken waren vollständig überschwemmt, so dass die Arbeiter bis zum Gürtel im Wasser arbeiten mussten. Die Arbeitszeit betrug im Minimum 11 Stunden ; dazu kam noch eine, in zwei Abteilungen geteilte, zwölfstündige Nachtarbeit. Gewöhnlich leisteten die Leute die Tages- und den Viertel einer Nachtarbeit, das heisst im Ganzen vierzehn Stunden angestrengtester Tätigkeit.

Die Arbeiter schliefen in mit Gras gedeckten, offenen Schuppen, ohne weiteren Schutz ; ihre Anzahl betrug anfangs kaum 350, erreichte aber später nahezu 4000 bei täglicher Arbeit.

Unter den geschilderten Verhältnissen schien nur die Chininprophylaxis am Platze ; doch lehnten sich die Arbeiter nach einiger Zeit gegen dieselbe auf, teils aus natürlicher Unwissenheit, teils weil es sich um eine Ansammlung heterogenster Elemente aus aller Herren Ländern handelte, welche zur niedrigsten Klasse gehörten und ihrer Natur nach indiscipliniert waren, wie sie sich auch nur aus Mangel an anderer Arbeit hier vereinigt hatten.

Als Zwangsmassregel konnte nur die Entlassung derjenigen, welche sich nicht meinen Vorschriften fügten, zur Anwendung kommen. Die Verteilung des Chinins fand durch zuverlässige Gehülfen statt, welche sich überzeugten, dass das Chinin verschluckt und nicht in der Hand, in der Kleidung oder unter der Zunge verborgen wurde, um dann später weggeworfen zu werden. Zuwiderhandelnde, welche die Kapsel hartnäckig zurückwiesen, wurden sofort entlassen.

Dieser anstrengende Dienst wurde Dank der Hingebung meiner Gehülfen und besônders von Dr. Ruy Ladisláu pünktlich ausgeführt und gestattete daher, meine Schlüsse nicht auf blosse Vermutungen, sondern auf sicher beobachtete Tatsachen zu gründen.

dos nossos auxiliares e principalmente do Dr. Ruy Ladisláu, permitindo assim, que, as nossas deduções se não bazeiem em supozições, mas, em fatos bem observados.

Alem dos operarios, existiam as familias de muitos delles que os acompanhavam e com as quais nada se podia fazer, pois que se recuzavam a tomar a quinina.

Assim, tinhamos no mesmo lugar, duas sortes de individuos em condições opostas, uns quinizados e outros não quinizados.

De Fevereiro a meiados do mez de Agosto, a profilaxia feita, administrando-se 50 centigramas de cloridrato de quinina de Merck de 3 em 3 dias, deu os melhores rezultados, conforme se vê no trabalho do Dr. Chagas (*Zeitschr. f. Hygiene* S. 321—334) (1908).

Em fins de Agosto, continuando baixo o numero de cazos de impaludismo, começámos a observar numero relativamente grande de cazos de primeira infeção, para os quais, havia certeza de não terem escapado á profilaxia em vigor e, que a principio, explicavamos por uma maior receptividade individual. Até este momento, os cazos de impaludismo eram fornecidos por individuos, que haviam transgredido ás nossas determinações.

Em Setembro, o mesmo fenomeno nos chamava a atenção, principalmente, pelo bom exito em geral do serviço profilatico, visto como aumentava o numero de operarios que então atinjia a 3.520, sendo a cifra de morbilidade reprezentada por 0,59 % ao passo que, nas familias destes, que tambem muito tinham aumentado e que se não submetiam ás medidas profilaticas, o numero de cazos de impaludismo era extraordinariamente grande e crecia sempre.

Assim, tinhamos diante de nós duas populações oferecendo perfeito contraste; de uma parte, pessoas afanando-se em trabalhos exaustivos e em magnificas condições

Ausser den Arbeitern gab es noch die Familien, von welchen viele derselben begleitet wurden; doch konnt man mit denselben nichts anfangen, da sie sich weigerten, Chinin zu nehmen.

Es gab daher am selben Orte zwei entgegengesetzte Klassen von Leuten, die teils von Chinin beeinflusst waren, teils nicht.

Vom Februar bis zur Mitte August gab die angewandte Prophylaxis (ein halbes Gramm salzsaures Chinin von Merck alle drei Tage) die besten Resultate, wie aus der Arbeit von Dr. Chagas (*Zeitschr. f. Hygiene* 1908, S. 312-334) hervorgeht.

Von Ende August an fanden sich bei einer niedrigen Gesammtzahl von Malariafällen relativ häufige Fälle primärer Infektion, trotzdem dieselben sich der üblichen Prophylaxe sicher nicht entzogen hatten, was ich Anfangs auf eine grössere individuelle Empfindlichkeit zurückführte. Bisdahin war die Malaria nur bei Leuten aufgetreten, welche den Anweisungen zuwidergehandelt hatten.

Im September fuhr diese Erscheinung fort, meine Aufmerksamkeit auf sich zu ziehen, besonders im Gegensatz zu dem guten Allgemeinresultat der Prophylaxis bei zunehmender Zahl der Arbeiter, die bereits 3.520 betrug (bei einer Mortalität von 0,59%), während innerhalb der Familien, deren Zahl ebenfalls sehr zugenommen hatte und welche sich den prophylaktischen Massnahmen nicht fügten, die Zahl von Malariafällen ausserordentlich gross und in stetem Zunehmen war.

So hatte ich vor mir zwei Klassen von Leuten, die einen vollständigen Kontrast boten; einerseits solche, die bei aufreibender Arbeit einen ausgezeichneten Gesundheitszustand zeigten; andererseits eine geringere Zahl von Frauen, Kindern, Kaufleuten und Fremden, welche vollständig von Malaria durchseucht waren.

Die Kranheitsfälle unter den in Chininbehandlung stehenden Arbeitern kamen ebensowohl an meinem Wohnorte, wie an verschiedenen anderen Plätzen zur Beobachtung.

de saude, de outra, população pouco menos numeroza e que era constituida por mulheres, crianças, negociantes, e forasteiros, totalmente atacados de impaludismo.

A morbilidade entre os operarios quinizados, era observada, não só no local, onde rezidiamos, como em varios outros.

Por essa epoca, chamou-nos tambem a atenção, o fato de operarios perfeitamente quinizados e que nunca tinham tido acessos no Xerém, indo ao Rio de Janeiro e permanecendo aí alguns dias sem tomar quinina, serem acometidos de febre palustre. Deste mez em diante, estes fatos começaram a se tornar de tal modo frequentes que afastavam qualquer duvida.

No mez de Outubro, rezolvemos modificar a quinização, estreitando mais o prazo, administrando-se daí por diante, 50 centigramas de 2 em 2 dias. Esta medida já estava sendo empregada com vantajem desde o mez anterior, entre os trabalhadores que construiam a Ponte de Iguassú, fóco dos mais perigozos, e onde os trabalhos se executavam dia e noite, trabalhando os operarios dentro d'agua.

Esta modificação trouxe uma melhoria geral, cessando os cazos de 1.ª infeção nas localidades, que seguiam a risca a quinização mais intensa. Isto, porem, de modo algum, modificou a frequencia cada vez maior, do fato que acima assinalámos, isto é, do adoecimento de individuos que passavam alguns dias no Rio de Janeiro sem o uzo da quinina.

De maneira que, uma situação absolutamente imprevista, se estava estabelecendo entre os trabalhadores e, era constituida, por esses individuos que, de volta do Rio de Janeiro, formavam elementos perigozos para o rancho onde habitavam, não só por estarem infetados, como principalmente, por serem estes, portadores de parazitos que, durante tempo mais ou menos longo, haviam sofrido a ação constante da quinina,

Zur selben Zeit wurde ich auf die Tatsache aufmerksam, dass Arbeiter, welche vorschriftsmässig Chinin gebraucht und in Xerém niemals Anfälle gehabt hatten, wenn sie nach Rio gingen und einige Tage daselbst verbrachten, ohne Chinin einzunehmen, von Malaria befallen wurden. Von diesem Monate an wiederholten sich solche Fälle so häufig, dass über die Tatsache kein Zweifel mehr bestehen konnte.

Im Oktober beschloss ich eine Modification der Chininbehandlung durch Verminderung der Intervalle, indem von da an alle zwei Tage 50 Centigramm gegeben wurden. Diese Massregel war schon seit dem vorigen Monate mit gutem Erfolge bei den Arbeitern angewandt worden, welche die Brücke über den Iguassú bauten ; es handelte sich daselbst um einen der gefährlichsten Heerde, wo die Arbeiter Tag und Nachts im Wasser arbeiteten.

Diese Abänderung war von einer allgemeinen Besserung gefolgt, indem die primären Erkrankungen an den Orten aufhörten, wo die intensivere Behandlung genau befolgt wurde. Dagegen wurden die immer häufigeren Fälle der Erkrankung von Leuten, welche einige Tage in Rio ohne Chiningebrauch verlebten, davon nicht berührt.

So entwickelte sich unter den Arbeitern eine gänzlich unerwartete Sachlage durch die Gegenwart von aus Rio zurückgekehrten Leuten, welche für ihre Umgebung gefährliche Elemente darstellten, weil sie nicht bloss infiziert, sondern auch Träger von Parasiten waren, welche während kürzerer oder längerer Zeit beständig der Chinineinwirkung unterworfen waren und an welche sie sich trotz behinderter Vermehrung gewöhnt haben konnten.

Mitte November begannen Malariaanfälle bei Leuten aufzutreten, welche alle zwei Täge Chinin genommen hatten und da dies sich wiederholte, beschloss ich täglich ein halbes Gramm zu geben, worauf die Anfälle ganz aufhörten, während am selben Orte die Malaria alle Leute befiel, welche kleinere Dosen nahmen.

que os tinha impedido de se multiplicarem e á qual se poderiam ter habituado.

Em meiados de Novembro, começaram a aparecer cazos de acessos palustres, em individuos quinizados de 2 em 2 dias e, como isto se repetisse, rezolvemos administrar 50 centigrammas, diariamente, o que fez cessar por completo os ataques de malaria; entretanto, nesta rejião, o impaludismo atacava quem quer que fosse que se submetesse a dozes menores.

A quinização diaria só poude ser feita com rigor em um local: o quilometro 54 que se achava sob as nossas vistas imediatas, e com os trabalhadores submetidos a este rejimen, ainda se observava do mesmo modo, o fenomeno do adoecimento quando iam ao Rio, embora tomassem quinina, pessoalmente por nós distribuida ainda no dia da partida. Este fato foi tambem observado com toda a evidencia, entre os medicos que adoeceram ao voltar ao Rio de Janeiro, apezar de um delles ter tido a cautela de continuar sob o mesmo rejimen durante 12 dias apoz a saida do Xerém; comtudo, 9 dias depois de ter cessado o emprego da quinina, foi acometido de impaludismo.

Uma unica dedução se impunha como concluzão aos fatos que vimos aduzindo: os hematozoarios do impaludismo tinham adquirido uma rezistencia especial á quinina.

Ao começar a profilaxia, o numero de infetados era grande; e iniciada a quinização, facilmente se debelou o parazito entre a população operaria. Com o correr do tempo e com a chegada das familias dos trabalhadores que se iam infetando aos poucos, porquanto não estavam submetidas á quinização, as anofelinas transmissoras, alimentando-se, ora nos habitantes que reprezentavam os depozitarios de virus, ou nos recemchegados não quinizados ou ainda, nos operarios quinizados de 3 em 3 dias, e que por isso possuiam o sangue em variavel gráo de riqueza quinica, dependente das horas decorridas da injestão do alcaloide, criaram para os hematozoarios, uma oportu-

Die tägliche Chinindarreichung konnte nur an einem Orte streng durchgeführt werden, der sich unter meiner direkten Aufsicht befand, nämlich bei Kilometer 54; bei den dieser Behandlung unterworfenen Arbeitern beobachtete man auch weiterhin die Erscheinung, dass dieselben erkrankten, wenn sie nach Rio gingen, obwohl sie noch am Tage ihrer Abreise, von mir persönlich verabreichtes, Chinin genommen hatten. Dasselbe wurde auch sehr deutlich bei den Aerzten beobachtet, welche nach ihrer Rückkehr nach Rio erkrankten, obgleich einer derselben ich selbst die Vorsicht hatte, nach dem Verlassen von Xerém noch 12 Tage dieselbe Behandlung fortzusetzen; trotzdem wurde derselbe neun Tage nach Einstellen des Chiningebrauches von Malaria befallen.

Aus den geschilderten Tatsachen lässt sich nur ein Schluss ziehen: die Hämatozoen der Malaria hatten eine besondere Resistenz gegen Chinin erworben.

Zu Beginn der Prophylaxe war die Anzahl der Inficierten gross, doch liessen sich die Parasiten bei der Arbeiterbevölkerung durch die eingeleitete Chininbehandlung leicht bekämpfen. Im weiteren Verlaufe und in Folge der Ankunft der Arbeiterfamilien, welche sich nach und nach inficierten, da sie kein Chinin nahmen, nährten sich die übertragenden Anophelinen bald vom Blute der Einwohner, welche die ursprüngliche Quelle der Parasiten bildeten, bald an frisch angekommenen, welche noch kein Chinin genommen hatten, bald an Arbeitern, welche alle drei Tage Chinin nahmen und deren Blut dasselbe je nach der seit der Einnahme verstrichenen Zeit in wechselnder Menge enthielt; auf diese Weise bot sich für die Hämatozoen eine Gelegenheit zur Anpassung, welche ihnen schliesslich eine Resistenzfähigkeit verlieh, die es ihnen ermöglichte, im Lauf der Generationen auffallend chininresistente Rassen zu bilden.

Im Januar 1908 erreichte die Arbeiterzahl 4000 und die Leute nahmen an einigen Tagen täglich, an anderen nur alle zwei Tage Chinin ein. An einigen

nidade de adaptação, que terminou por lhes dar a rezistencia que os capacitou, atravez das suas gerações, a se diferenciar claramente em raças rezistentes á quinina.

Em Janeiro de 1908, o numero de operarios elevava-se a 4.000 homens que eram quinizados, em alguns logares, diariamente, em outros de 2 em 2 dias ; em algumas localidades nunca conseguimos, por varios motivos, uma organização regular, que permitisse segura quinização.

Assim, por esta epoca, para algumas *ranchações* que abrigavam de 80 a 140 homens, 8 a 10 % dos seus moradores tinham se tornado gametoforos, e, como a quinização era em igual doze para estes e para os não infetados, os transmissores, que sanguesugassem um gametoforo, sempre que repetissem as refeições, encontravam prezente no sangue uma quantidade de alcaloide mais ou menos igual para todos os operarios. Deste modo, passando de gametos acostumados a viver em meio onde a quinina estava sempre prezente, os hematozoarios, continuavam já em outro ciclo, de ooquineto até á refeição final que lançasse o esporozoito na circulação, a se dezenvolver ainda na prezença da quinina.

E foi assim que, com o tempo, passando dos depozitarios de virus para as familias dos operarios, destas para os trabalhadores quinizados insuficientemente de 3 em 3 dias, aos pou os, se foi formando uma raça de parazitos de crecente rezistencia ao alcaloide, circumstancia, que nos obrigou a estreitar a distribuição para cada 2 dias em logares onde, mezes antes, a quinização mais espaçada era perfeitamente suficiente.

Estes fatos não se observavam em todas as localidades, onde se executava a profilaxia, porem, em logares já dezignados acrecidos do local quilometro 43, onde se formou uma raça altamente rezistente. Aos individuos que aí trabalhavam, quando se infetavam tornava-se necessario aumentar a doze terapeutica e, apezar disto, permane-

Plätzen wurde aus verschiedenen Gründen niemals eine geordnete Organisation erzielt, welche einen regelmässigen Chiningebrauch gestattet hätte.

Zu dieser Zeit waren in einigen Niederlassungen von 80 bis 140 Leuten 8 bis 10% der Einwohner zu Gametenträgern geworden und, da sie dieselben Chinindosen nahmen, wie die uninficierten, so fanden die übertragenden Mücken, nachdem sie an einem Gametenträger gesogen hatten, bei jeder neuen Aufnahme von Blut, in demselben das Alcaloid und zwar in einer Proportion, welche bei allen Arbeitern annähernd dieselbe war. Demgemäss begannen die Parasiten als Gameten, welche an ein beständig Chinin enthaltendes Medium gewöhnt waren und machten den nächsten Entwicklungscyclus vom Ookineten bis zur Uebertragung der Sporozoiten durch die Mücke auf den Menschen beständig unter dem Einflusse des Chinins durch.

Auf diese Weise bildete sich eine Parasitenrasse von immer grösserer Chininresistenz aus, indem sie von den ursprünglichen Krankheitsträgern auf die Familien der Arbeiter und von diesen auf die nicht genügend — nämlich nur alle drei Tage — mit Chinin behandelten Arbeiter überging ; dieser Umstand zwang mich das Intervall der Chinindosen auf zwei Tage herabzusetzen, während einige Monate vorher am selben Orte eine weniger häufige Darreichung völlig genügte.

Diese Verhältnisse wurden nicht an allen Orten beobachtet, wo eine Prophylaxe stattfand, sondern nur an den bereits bezeichneten Stellen und ausserdem bei Kilometer 43, wo sich eine sehr chininresistente Rasse ausbildete. Bei den daselbst arbeitenden Leuten musste bei stattgefundener Erkrankung die therapeutische Dose erhöht werden und trotzdem zeigten sie ein grösseres Mittel von Krankheitstagen, als die Malariakranken von anderen Stellen.

Im Januar beobachtete ich, dass einer von den Aerzten, Dr. Ruy Ladisláu, der seit Juni täglich 50 Centigramm einnahm,

ciam doentes maior numero de dias que os impaludados das outras localidades.

Em Janeiro, vimos um dos medicos, o Dr. Ruy Ladisláu, que se quinizava desde Junho, com 50 centigramas diarios, interromper por 2 dias esta observancia, recomeçando findo este prazo a se quinizar nas mesmas dozes, e logo ser acometido de violento acesso de terçã maligna. Tinhamos conhecimentos de fatos mais ou menos analogos, porem, por não o podermos asseverar seguramente, temiamos errar, tomando-os em consideração. Finalmente, não havia mais motivos para duvida. Os fatos izolados, a principio sorpreendentes, foram-se acumulando.

Em certos logares, devido ao conjunto de circumstancias já referidas, a unica quinização que ainda lograva dar rezultados, era *a de 50 centigramas tomados sem excepção de um só dia.*

Com estas dozes diarias nunca observámos irromper acessos; mas o que verificámos e afirmamos é que varios *individuos quinizados diariamente alguns, nos primeiros mezes com 30 centigramas e depois com 50 centigramas durante o espaço de 8 mezes a mais de um ano e um delles com 11 mezes de quinização diaria a 50 centigramas, não tendo havido sequer uma falta* (nosso cazo), *ao abandonarem definitivamente a rejião e o uzo do profilatico, depois de 9 a mais de 30 dias foram acometidos de impaludismo.* Houve numerozos cazos de individuos, que, quinizados diariamente *com 30 centigramas*, máo grado esta doze, se infetaram; mais raros os que em uzo diario de 50 centigramas, interrompendo por um a dois dias somente o emprego da quinina foram prezas da malaria.

O que avultou e complicou de muito a profilaxia foi o numero de pessoas quinizadas intensamente durante mezes sucessivos que, ao se afastar temporariamente dos fócos onde a malaria reinava intensa, ao deixar o medicamento se surpreendiam com impaludismo.

nachdem er einmal während zwei Tagen ausgesetzt hatte, obwohl er nachher den Chiningebrauch in derselben Dose wieder aufnahm, einen heftigen Anfall von Tertiana maligna durchmachte. Aehnliche Fälle waren mir bereits bekannt, doch scheute ich mich, in Hinsicht auf eine weniger zuverlässige Beobachtung, Schlüsse daraus zu ziehen. Doch blieb schliesslich kein Grund zum Zweifel mehr, da die anfangs vereinzelten und überraschenden Fälle sich häuften.

In Folge der auseinandergesetzten Verhältnisse liess sich an gewissen Orten nur durch *tägliche, auch nicht einmal unterbrochene Einnahme von 0,5 Chinin* ein Resultat erzielen.

Bei dieser täglichen Dosis beobachtete ich niemals das Auftreten von Anfällen; wohl aber stellte ich bestimmt fest, dass verschiedene Leute nach definitem Verlassen der Gegend und Aufgeben der prophylaktischen Dosen, nach einem Zeitraume von 9 bis 30 Tagen von Malaria befallen wurden, obgleich sie vorher täglich Chinin genommen hatten. Mehrere derselben nahmen in den ersten Monaten 0,3 und nachher, während acht Monaten bis zu mehr als einem Jahre, 0,5 Gramm, während ich selbst erkrankte, obgleich ich während 11 Monaten, ohne eine Ausnahme, täglich ein halbes Gramm einnahm. Es gab zahlreiche Fälle von Leuten, welche trotz täglichem Gebrauche von 30 Centigramm sich inficierten und seltenere, die bei einer Tagesdose von 0,5 nach ein- bis zweitägigem Aussetzen an Malaria erkrankten.

Was besonders hervortrat und die Prophylaxe erschwerte, war die Anzahl von Leuten, welche während einer Anzahl von Monaten ununterbrochen Chinin genommen hatten und, nach Verlassen der intensiven Malariaheerde und Aussetzen des Medicamentes, von Malaria überrascht wurden.

So wurde uns klar, dass in gewissen Arbeitergruppen, die Plasmodien sich, sowohl beim Menschen, wie bei den übertragenden Stechmücken, immer in einem chininhaltigen Medium befanden und in

Para nós ficou patenteado, que, em certos nucleos de operarios, os plasmodios se cultivavam quer nos homens, quer nos transmissores, sempre num meio quinizado e, devido a esta circumstancia, formaram-se raças rezistentes á quinina.

Os fatos acima apontados não condenam a profilaxia quinica, em trabalhos da natureza dos que a Inspetoria Geral de Obras Publicas levou a cabo.

As raças rezistentes não se formaram simultaneamente em toda a zona submetida á quinização; mas somente nos nucleos de população, onde concomitantemente existiam os já referidos fatores eficientes da rezistencia.

No quilomero 54 onde estes fatos eram mais constantes e onde a profilaxia existia ha mais tempo, por isso mesmo, tinhamos a raça mais rezistente; para esta localidade, já havia uma raça que *evolvia dando acessos, em individuos quinizados diariamente a 30 centigramas.* Aí a quinização de 2 em 2 dias a 50 centigramas já era insuficiente para prevenir, a interrupção de 2 dias num individuo quinizado a 50 centigramas, embora recomeçasse o uzo do alcaloide findo este prazo, já era incapaz de impedir o acesso, que se dava 2 ou 3 dias apoz se ter recomeçado a injerir os 50 centigramas.

Foi entre os trabalhadores rezidentes neste quilometro que, com segurança, pudemos afirmar que apezar de serem quinizados diariamente nas dozes de 50 centigramas, operarios até então imunes, depois de permanencia de 4 mezes a mais, máo grado termos tomado a precaução de não excetual-os da quinização, nem no dia da partida, verificámos o impaludismo acometer a muitos delles quando, já na cidade do Rio de Janeiro, algum tempo depois de terem abandonado o uzo da quinina.

Até na enfermaria, observámos que os doentes das zonas citadas, ofereciam maior rezistencia ao especifico, principalmente os do quilometro 54 e 47, havendo necessidade

Folge dessen chininresistente Rassen gebildet wurden.

Die angeführten Tatsachen sprechen nicht gegen die Chininprophylaxe bei derartigen Arbeiten, wie sie die Aufsichtsbehörde der öffentlichen Arbeiten zu Ende führte.

Die chininresistenten Rassen bildeten sich nicht gleichzeitig in der ganzen dem Chiningebrauche unterworfenen Zone, sondern nur in denjenigen Gruppen, wo zugleich die bereits erwähnten Bedingungen für die Erhöhung des Widerstandes zur Geltung kamen.

Bei Kilometer 54, wo diese Verhältnisse am beständigsten waren und wo die Prophylaxe am frühesten begonnen hatte, hatten wir deswegen auch die widerstandsfähigste Rasse, die *selbst bei Individuen, die täglich 30 Centigramm nahmen, sich entwickelte und Anfälle hervorrief.* Hier war es für die Vorbeugung bereits ungenügend, alle zwei Tage Chinin zu geben und wenn bei Leuten, die ein halbes Gramm einnahmen, eine Unterbrechung von zwei Tagen stattfand, so war die Wiederaufnahme der Chininbehandlung nicht mehr im Stande dem Anfalle vorzubeugen, welcher dann zwei bis drei Tage nach derselben stattfand.

Bei den hier lebenden Arbeitern konnten wir mit Sicherheit beobachten, dass auch bisher uninficierte, welche täglich ein halbes Gramm Chinin eingenommen hatte und sich vier Monate an Ort und Stelle aufhielten und trotzdem ich die Vorsicht gebraucht hatte, auch am Tage ihrer Abreise den Chiningebrauch nicht zu unterbrechen, zum grossen Teile bereits in Rio einige Zeit nach Aussetzen des Chinins von Malaria befallen wurden.

Selbst im Spitale beobachteten wir, dass die Patienten aus den befallenen Zonen der specifischen Behandlung mehr Widerstand entgegensetzten und zwar ganz besonders die von Kilometer 54 und 47, so dass man grössere Dosen anwenden musste, als beim Durchschnitte der Patienten von anderer Herkunft.

de empregarmos maiores dozes que as do geral dos doentes de outras proveniencias.

Das nossas verificações concluimos que a quinização constante entre populações impaludadas, quando não atinjir de uma só vez á massa total de habitantes, acabará por dar aos hematozoarios os meios de ir adquirindo uma rezistencia ao especifico a ponto de se diferenciarem em raças.

Aus meinen Erhebungen schliesse ich, dass eine fortgesetzte Chininbehandlung bei malariainficierten Bevölkerungen, falls sie nicht auf einmal die gesammten Einwohner betrifft, schliesslich den Hämatozoen die Mittel liefert, nach und nach eine solche Resistenz gegen das specifische Heilmittel zu erwerben, dass sie zur Bildung einer unterschiedlichen Rasse führt.

Algumas considerações sobre a infeção tuberculoza e o seu respetivo virus

PELO

Dr. A. Fontes,

(Assistente.)

Bemerkungen ueber die tuberculoese Infection und ihr Virus

VON

Dr. A. Fontes,

(Assistenten am Institute.)

Grande cópia de trabalhos tem sido aprezentada ultimamente sobre a forma granular de MUCH, que se orijina da ação da tuberculo-ciraze sobre o conteúdo cirogordurozo do bacilo de Koch quando existente no púz ou que se mostra nos tecidos infetados por tuberculoze quando os bacilos não possuem materiais de natureza graxa no seu interior. Esses bacilos não são, por consequencia, revelaveis pelo ZIEHL que até ha poucos anos atraz traduzia a reação carateristica do bacilo da tuberculoze.

Nesses cazos, o metodo de GRAM ou qualquer de suas modificações que sem grande vantajem se tem aprezentado, mostra a existencia de bacilos ou granulações, que são os responsaveis diretos pelas lezões verificadas.

A inoculação destes materiais mostra sempre que se trata da infeção tuberculoza.

Na lepra a analojia prevê que se observe o mesmo fenomeno que na tuberculoze, e nos numerozissimos cazos em que a pesquiza do bacilo é negativa, o que vem

Die granulären Formen von MUCH, welche durch die Wirkung der Tuberculocirase auf den Wachs- und Fettgehalt des KOCH'schen Bacillus entstehen, wenn derselbe im Eiter existiert, oder in tuberkulösen Geweben auftreten, wenn die Bacillen kein fetthaltiges Material einschliessen, haben neuerdings den Gegenstand zahlreicher Arbeiten gebildet. Solche Bacillen lassen sich natürlicherweise durch die ZIEHL'sche Methode, welche bis vor Kurzem als charakteristische Reaktion der Tuberkelbacillen galt, nicht sichtbar machen.

In solchen Fällen zeigt die GRAM'sche Methode (oder eine ihrer Modificationen, wie sie ohne besondere Vorteile angegeben wurden) das Vorkommen von Bacillen oder Granulationen, welche für die nachgewiesenen Veränderungen direkt verantwortlich sind.

Die Einimpfung solchen Materiales zeigt regelmässig, dass es sich um eine tuberkulöse Infektion handelt.

In analoger Weise lässt sich bei der Lepra dasselbe Phänomen, wie bei der Tuberculose, erwarten und bei den zahlreichen Fällen, in welchen der Nachweis

sobremodo complicar o diagnostico (lepra anestezica), é possivel que a forma granular do bacilo de HANSEN seja revelada e que desta sorte o diagnostico possa ser feito, atendendo principalmente ao volume das granulações muito maior nestas que nos bacilos da tuberculoze.

D'aí se infere que o papel da granulação é preponderante, tanto em relação ao organismo infetado como ao bacilo, pois que essa forma é a de maior rezistencia que elle aprezenta.

Pudemos experimentalmente determinar a função da granulação em relação ao bacilo, e isso consta de trabalho já entregue á redação destas « Memorias », que oportunamente será publicado. Acompanhando o dezenvolvimento das culturas homojenias pudemos verificar que a granulação por um processo de divizão analogo á gemulação dá orijem a outras granulações que se tornam centros de reprodução por sua vez.

Durante certa faze de dezenvolvimento, as granulações conservam-se ligadas por delgados filamentos, constituindo grumos, o que explica, juntamente com o meio de reprodução acima referido, o paralelismo dos bacilos em grumos, a correspondencia linear e as diferenças de volume das granulações.

Mais tarde a elaboração e o depozito de substancias diversas entre as quais aprezentam maior importancia as de natureza graxa, sobrecarregam esses filamentos de modo que elles se rompem, simulando divizão lonjitudinal.

Estas observações foram feitas em preparações córadas pela hematoxilina de HEIDENHAIN e DELAFIELD e pelo metodo de coloração que propuz para diagnostico diferencial do bacilo de KOCH com os outros acido-rezistentes e que se presta ao

des HANSEN'schen Bacillus nicht gelingt (was die Diagnose ganz besonders erschwert), kann man vielleicht die granuläre Form des Leprabacillus nachweisen und so die Diagnose machen, indem man berücksichtigt, dass hier das Volumen der Granulationen viel grösser ist, als bei den Tuberkelbazillen.

Es ergibt sich so die wichtige Rolle der Granula, sowohl in Hinsicht auf den befallenen Organismus, als für den Bacillus selbst, der in dieser Form die grösste Widerstandsfähigkeit darbietet.

Die Function der Granulationen in ihrer Beziehung zum Bacillus habe ich experimentell nachweisen können, wie aus einer Arbeit hervorgeht, welche bereits der Redaction der « Memoiren » dieses Instituts übergeben wurde und welche bei passender Gelegenheit veröffentlicht werden soll. Indem ich die Entwicklung der homogenen Kulturen verfolgte, konnte ich feststellen, dass die Granula durch einen der Sprossung analogen Teilungsprocess neue Granula erzeugen, welche wiederum zu Reproductionscentren werden.

Während eines gewissen Entwicklungsstadiums bleiben die Körner durch zarte Fäden verbunden und bilden so kleine Massen, was unter Berücksichtigung der erwähnten Vermehrungsweise, sowohl die parallele Richtung der Bacillen in diesen Klümpchen, als auch die Anordnung in Reihen und die Grössenunterschiede der Granula erklärt.

Später erfolgt durch die Bildug und Ablagerung verschiedener Substanzen (unter welchen die fettartigen von besonderer Wichtigkeit sind) eine Ueberladung dieser Filamente, so dass sie zerreissen, wodurch eine Längsteilung nachgeahmt wird.

Diese Beobachtungen wurden an Präparaten gemacht, welche mit Hämatoxylin nach HEIDENHAIN und DELAFIELD und nach der, von mir zur Differenzierung der KOCH'schen von anderen säureresistenten Bacillen vorgeschlagenen Methode gefärbt waren ; letztere eignet sich zum Studium

estudo da estrutura desses bacilos por delles dar a dupla coloração e revelar desta sorte a prezença de substancias graxas, quando nelles existentes. Verificações tais foram feitas, tanto em culturas como em produtos patolojicos (puz), ganglios e pulmões tuberculozos.

Em preparações córadas pela hematoxilina e fortemente diferenciadas observam-se *granulações refrinjentes nas quais nitidamente se vê um plano de divizão de modo a se formarem duas porções deziguais que aprezentam os bordos córados, mostrando haver aí uma condensação de substancia cromatica; o centro da granulação aprezenta-se como um ponto não córado.* Esse fato dá orijem á existencia no grumo de uma granulação maior que as outras. Acreditamos que a reprodução do bacilo da tuberculoze confirma a concepção de HARTMANN sobre os nucleos polienérjides, e, assim, a granulação reprezentaria, como de fato o faz, o centro de reprodução. Em outras palavras : *a granulação é o elemento vivo infetante na tuberculoze.*

Verifica-se isso nos cazos patolojicos onde o bacilo não poude ser revelado e onde a granulação existe. Na mesma escrofula, até onde nossa observação poude chegar, não se consegue demonstrar a prezença de bacilo pela reação classica, comquanto exista a granulação ou grumo de granulações, ligadas entre si, revelaveis pelo metodo uzual de GRAM.

Que a granulação é o elemento infetante, conseguimos demonstrar separando-a, no puz tuberculozo dos bacilos que aí pudiam existir por filtros BERKEFELD, modelo NORDMEYER, que não davam passajem ao *vibrio-choleræ*, á *sarcina lutea* e ao virus da *cholera gallinarum*. Assim tambem se explica e se demonstra a tuberculoze latente.

Foi o que obtivemos com a inoculação de puz filtrado em cobaias que, sacrificadas

dieser Bacillen, weil sie eine Doppelfärbung gibt und so das Vorkommen fettartiger Substanzen anzeigt. Es wurden nicht nur Kulturen, sondern auch inficierte Organismen untersucht und zwar von letzteren Eiter, sowie tuberkulöse Lymphdrüsen und Lungen.

In mit Hämatoxylin gefärbten und stark differenzierten Präparaten beobachtet man *stark lichtbrechende Granula, in welchen man deutlich eine Teilungsebene erkennt; es bilden sich so zwei ungleiche Teilstücke, deren gefärbte Ränder zeigen, dass daselbst eine Verdichtung der chromatischen Substanz stattfand, während das Centrum als ungefärbter Punkt erscheint.* Durch diesen Vorgang wird im Innern des Klümpchens ein Granulum gebildet, welches grösser ist, als die übrigen. Ich glaube, dass die Vermehrung des Tuberkelbazillus die HARTMANN'sche Idee der polyenergetischen Kerne (1909) bestätigt und dergestalt die Granulation das Reproduktionscentrum darstellen würde, wie es tatsächlich der Fall ist. In anderen Worten : *Bei der Tuberculose ist die Granulation das lebende und infektiöse Element.*

Es ergibt sich dies durch die Untersuchung pathologischer Zustände, wo der Bacillus sich nicht sichtbar machen lässt, während die Granulationen vorhanden sind. Bei der Scrophulose selbst gelang es mir, soweit meine Untersuchungen reichten, nicht, durch die klassische Färbung Bacillen nachzuweisen, während durch die gewöhnliche Gram'sche Methode Granula oder Anhäufungen gegenseitig verbundener Körnchen sichtbar gemacht werden.

Dass die Granulationen wirklich das infektiöse Element sind, konnte ich beweisen, indem ich sie im tuberculösen Eiter von etwa vorhandenen Bacillen durch BERKEFELD'sche Filter (Modell von NORDMEYER) trennte ; letzteres liess Choleravibrionen, *Sarcina lutea* und das Virus der Hühnercholera nicht passieren.

Auf dieselbe Weise lässt sich die latente Tuberculose erklären und nachweisen.

ao cabo de um mez não revelaram lezão que induzisse a crer em tuberculoze, salvo a existencia de celulas embrionarias, que possuiam granulações incluidas e revelaveis pelo GRAM. Inoculações feitas com os organs desses animais em outras cobaias mostraram *que a tuberculoze se reproduziu em serie pois que os animais sacrificados, 6 mezes depois, mostravam em córtes dos ganglios e pulmões bacilos de tuberculoze em numero muito pequeno, porém caraterizaveis pela hematoxilina pela solução de* ZIEHL, *tratada depois pelo acido azotico ao terço e pelo* ZIEHL-GRAM (FONTES). *Durante o prazo de 5 mezes, a cobaia se conservou em saude aparente.*

Outra cobaia inoculada no peritônio com puz filtrado e sob a tecnica acima referida viveu 6 mezes com aparencia de saúde; sacrificada ao cabo desse tempo, *mostrou bacilos nos pulmões*, verificados em cortes desse orgam.

Essas experiencias nos mostram que em ambos os cazos o material da infeção se atenuou pela filtração, pois que em um delles o puz proveiu de ganglios cazeificados de uma cobaia infetada com tuberculoze humana e em outro cazo de um escarro purulento.

Acreditamos que estas observações nos mostram o caminho para a demonstração da tuberculoze latente, como deve existir nas tuberculozes locais antes de suas manifestações, que em geral se aprezentam em virtude da diminuição de rezistencia do tecido.

Outro ponto muito importante a elucidar é o da herança tuberculoza; nada impede que a granulação se transmita ao feto atendendo ás dimensões della, que são compativeis com a passajem atravez o filtro.

Acreditamos que, não só se herda o terreno tuberculizavel, como o virus sob a

Ich erreichte dies durch Verimpfung von filtriertem Eiter auf Meerschweinchen, welche nach einem Monate getötet wurden und ausser dem Vorkommen von Rundzellen mit eingeschlossenen, nach GRAM färbbaren Körnchen nichts aufwiesen, was auf Tuberkulose deutete. Material von den Organen dieser Tiere, auf ein anderes Meerschweinchen übertragen, zeigte, *dass sich die Tuberkulose in Serien fortpflanzte, indem dieses Tier bei der Tötung nach 6 Monaten in Lymphdrüsen- und Lungenschnitten Tuberkelbazillen in sehr geringer Zahl aufwies, welche sich durch Färbung mit Hämatoxylin und* ZIEHL'*scher Lösung und Entfärbung mit Salpetersäure (1:2), sowie durch Färbung mit* ZIEHL-GRAM (FONTES) *darstellen liessen. Während einer Beobachtungszeit von 5 Monaten war das Meerschweinchen anscheinend gesund.* Ein anderes Meerschweinchen, welches unter Befolgung der beschriebenen Technik intraperitoneal mit tuberkulösem Eiter geimpft wurde, lebte noch sechs Monnate ohne Krankheitserscheinungen; es wurde dann getötet und enthielt in den Lungen Bacillen, welche in Schnitten nachgewiesen wurden.

Diese Versuche zeigen, dass, in beiden Fällen, das infektiöse Material durch die Filtration eine Abschwächung erlitt, da in einem Falle Eiter aus den verkästen Lymphdrüsen eines mit menschlicher Tuberculose inficierten Meerschweinchens und im anderen Falle eitriges Sputum verimpft wurde.

Ich glaube, dass diese Beobachtungen uns den Weg für den Nachweis der latenten Tuberkulose zeigen, wie sie bei der localen Tuberculose vor dem Auftreten der Heerde besteht, welche in der Regel in Folge einer Herabsetzung des normalen Resistenz der Gewebe auftreten.

Ein anderer wichtiger Punkt, welcher der Aufklärung bedarf, ist die Vererbung der Tuberculose; hier steht einer Uebertragung der Granulation auf den Fötus nichts im Wege, da ihre geringe Dimensionen ja die Passage durch Filter gestatten.

fórma de granulação, que póde permanecer em latencia (na cobaia durante 1 mez) ou em evolução lenta (cobaia inoculada em serie e cobaia inoculada no peritônio, durando a evolução 6 mezes). Os cazos de escrófula podem ser considerados como reprezentantes desses tipos de herança.

Na clinica são muito frequentes os cazos que não podem ser explicados por contajio, principalmente na primeira infancia, onde a escrofula faz devastações e se manifesta por suas modalidades proteiformes.

Ha mesmo quem acredite — e nós estamos entre estes — que o proprio raquitismo é consequencia da infeção tuberculoza. (MARFAN, 1910).

Em rezumo: — A infeção tuberculoza é devida á granulação do bacilo que nelle reprezenta a unidade vital; é o seu centro de reprodução. Sua divizão se faz por processo semelhante aos dos nucleos, descrito por HARTMANN (1909) e HARTMANN & CHAGAS (1910). A granulação pode existir em latencia ou evolver tão lentamente, que os bacilos formados permaneçam sem cauzar dano especial, ou, dando orijem aos cazos clinicos, onde a tuberculoze é prezumida e não pode ser demonstrada pelos metodos classicos de coloração. Pode-se experimentalmente reproduzir essa infeção muitissimo atenuada filtrando em véla, o puz virulento.

A experimentação em 160 cobaias infetadas com tuberculoze virulenta nos autoriza a crêr na atenuação da infeção conseguida pela injeção de tuberculo-ciraze.

O tipo clinico e anatomico da tuberculoze nesses animais modificou-se, aprezentando-se os ganglios nos animais que receberam a tuberculo-ciroze, inteiramente cazeificados, constituindo abcessos que evolvem até a eliminação espontanea do puz e consequente cicatrização, *sem formação*

Ich denke, dass man sowohl, die Disposition zur Tuberculose, als auch das Virus in seiner granulären Form ererbt; letzteres kann latent bleiben oder sich langsam entwickeln, in Uebereinstimmung mit dem Resultate der obigen Versuche. Die scrofulösen Erkrankungen können als Beispiele dieses Vererbungstypus angesehen werden.

In der Klinik sind Fälle, welche sich durch Ansteckung nicht erklären lassen, sehr häufig, besonders in der ersten Kindheit, wo die Skrofulose in ihren manigfachen Formen verheerend auftritt. Es gibt übrigens Autoren, welche selbst die Rhachitis als Folge einer tuberkulösen Infektion auffassen (MARFAN 1910), und ich selbst teile diese Anschauung.

Kurz gefasst: Die tuberkulöse Infection wird durch die Granula des Bacillus, welche die Lebenseinheit desselben darstellen, verursacht. Sie sind sein Reproduktionszentrum. Ihre Teilung findet in ähnlicher Weise statt, wie es von HARTMANN (1909) und HARTMANN und CHAGAS (1910) für die polyenergiden Kerne beschrieben worden ist. Das Vorkommen der Granulationen kann die klinischen Fälle erklären, bei welchen Tuberculose angenommen wird, ohne dass sie durch die klassische Färbemethode nachweisbar wäre; sie können auch zur Bildung von Bacillen führen, ohne eine schwere Schädigung zuveranlassen. Eine solche stark abgeschwächte Infektion lässt sich durch Filtration des Eiters mit BERKEFELD-NORDMEYER'scher Kerzen erzielen

Meine Beobachtungen an 160 Meerschweinchen, welche mit virulenter Tuberkulose infiziert wurden, gestattet mir, die Abschwächung der Infektion durch Injection von Tuberculocirase zu behaupten. Bei diesen Tieren änderte sich der anatomische und klinische Typus der Tuberkulose, indem sich bei den behandelten Meerschweinchen die Lymphdrüsen vollständig verkäst erwiesen und Abcesse bildeten, welche zur spontanen Entleerung des Eiters und nachfolgender Vernarbung führten,

de fistula; isto em relação aos ganglios sub-cutaneos. Relativamente aos mais profundos, aprezentaram-se elles inteiramente cazeificados, constituindo fócos de supuração nitidamente limitados por espessa membrana (ganglios do hilo do figado e mediastino). Alguns animais aprezentaram a infeção da pele claramente caraterizada por tuberculides.

ohne Weiterbestehen einer Fistel, soweit es sich um subcutane Drüsen handelte; die tief gelegenen Leberhilus- und Mediastinaldrüsen erschienen vollkommen verkäst und bildeten durch eine dicke Membran scharf abgegrenzte Eiterheerde. Bei einigen Tieren zeigte sich eine durch Tuberculide gekennzeichnete Hautinfektion.

BIBLIOGRAFIA.

HARTMANN, MAX . . . 1909 Polyenergide Kerne.
Biol. Centralbl. Bd. XXIX, n. 15 und 16 ausgegeben am 1 und 15 August 1909.

HARTMANN, MAX & CHAGAS, CARLOS . 1910 Estudos sobre flajelados.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Ano II. Fac. I.

MARFAN, A., B. . . . 1910 Rachitisme et tuberculose.
« La Presse Médicale » n. 2. — 5 janvier, pag. n. 16.

TOMO II FACICULO II

MEMORIAS

DO

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RIO DE JANEIRO — MANGUINHOS

1910

SUMARIO:

Paj.

I — Dr. S. VON PROWAZEK — Contribuição para o conhecimento da fauna de protozoarios do Brazil (Com trez figuras no texto) 149
II — Prof. Dr. MAX HARTMANN e Dr. CARLOS CHAGAS — Sobre a divizão nuclear da Amoeba hyalina Dang. (Com estampa 10) 159
III — Dr. CARLOS CHAGAS — Estudos de citolojia em nova especie de coccidio, "Adelea hartmanni", do intestino do Dysdercus ruficollis L (Com as estampas 11—15) 168
IV — Dr. A. FONTES — Estudos sobre tuberculoze (Com as estampas 16 e 17) 186
V — Dr. ARTHUR NEIVA — Informaçõis sobre a biolojia do Conorhinus megistos Burm 206
VI — Dr. ADOLPHO LUTZ — Segunda contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Similium" (Com as Estampas 18—21) 213
VII — Dr. ARTHUR MOSES — Soro antidizenterico. Metodos de dozajem 268
VIII — Dr. GOMES DE FARIA — Contribuição para a sistematica helmintolojica brazileira. III. Ancylostomum braziliense n. sp. Parazito dos gatos e câis (Com estampa 22).. 286

SOMMAIRE:

I — Dr. S. VON PROWAZEK — Beitrag zur Kenntnis der Protozoenfauna Brasiliens (Mit 3 Figuren) 149
II — Prof. Dr. MAX HARTMANN und Dr. CARLOS CHAGAS — Ueber die Kernteilung von Amoeba hyalina Dang (Mit Taf. 10) 159
III — Dr. CARLOS CHAGAS — Cytologische Studien über "Adelea hartmanni", ein neues Coccidium aus dem Darme von Dysdercus ruficollis L. (Mit Tafeln 11—15) 168
IV — Dr. A. FONTES — Studien über Tuberkulose (Hierzu Tafeln 16 und 17) 186
V — ARTHUR NEIVA — Beiträge zur Biologie des Conorhinus megistus Burm 206
VI — Dr. ADOLPH LUTZ — Zweiter Beitrag zur Kenntnis der brasilianischen Simuliumarten. (Mit Tafeln 18—21) 213
VII — ARTHUR MOSES — Ueber Dysenterieserum und seine Wertbestimmung 268
VIII — Dr. GOMES DE FARIA — Contribution towards the classification of brazilian Entozoa. III. Ancyclostumum braziliense n. sp. Parasite of cats and dogs. (With Plate 22).. 286

AVIZO As « MEMORIAS » serão publicadas em faciculos, que não aparecerão em datas fixas e que formarão volumes de mais ou menos 200 pajinas. No minimo, aparecerá um volume por ano.

Na parte escrita em portuguez foi adotada a grafia aconselhada pela Academia de Letras do Rio de Janeiro.

Toda correspondencia relativa ás « MEMORIAS » deverá ser dirijida ao « **Diretor do Instituto Oswaldo Cruz — Caixa postal 926 — Manguinhos — Rio de Janeiro** ». Endereço telegrafico: « **Manguinhos** ».

AVIS Les « MEMOIRES » seront publiés par fascicules qui ne paraitront pas en époques déterminées et qui formeront des volumes d'à peu près 200 pages. Il paraitra chaque année, au moins, un volume.

La partie portugaise est écrite selon la graphie adoptée par l'Académie de Lettres de Rio de Janeiro.

Toute correspondance doit être adressée au « **Directeur de l'Institut Oswaldo Cruz — Caisse postale 926 — Manguinhos — Rio de Janeiro** ». Adresse télégraphique: « **Manguinhos** ».

Contribuição para o conhecimento da fauna de protozoarios do Brazil

PELO

Dr. S. von Prowazek.

(Com trez figuras no texto.)

Beitrag zur Kenntnis der Protozoenfauna Brasiliens

VON

Dr. S. von Prowazek.

(Mit 3 Figuren.)

Durante o segundo semestre de 1908 (Julho até Dezembro) na séção de protozoolojia do Instituto Oswaldo Cruz empreendemos em colaboração com o Dr. H. de Beaurepaire Aragão o estudo sistematico dos protozoarios encontrados nas cercanias de Manguinhos. Antes de, bazeado nessas pesquizas, concluir algo sobre a fauna de protozoarios, transcreveremos aqui a lista dos encontrados:

I. RHIZOPODA.

Amoeba proteus (Roesel-Leidy).
» limax (Dujardin).
» villosa (Wallich).
» terricola (Ehrb.), variedade descrita por Carter.

Amoeba quadrilineata (esta especie cultivou-se durante muito tempo em placa de agar).

Dactylosphaerium radiosum (Ehrb.).
Pelomyxa palustris (Greef).
Entamoeba buccalis (Prow.).
Difflugia globulosa (Dujardin).

Während des zweiten Halbjahres (Juli — Dezember, 1908) wurden in der Abteilung für Protozoenkunde im Institut « Oswaldo Cruz » in Gemeinschaft mit Dr. H. de Beaurepaire Aragão systematische Untersuchungen über in der Nähe von Manguinhos gefundene Protozoen angestellt. Bevor wir auf Grund dieser Untersuchungen einige Schlüsse faunistischer Natur ziehen, sei hier zunächst eine Liste der gefundenen Protozoen mitgeteilt.

I. RHIZOPODA.

Amoeba proteus (Roesel-Leidy).
» limax (Dujardin).
» villosa (Wallich).
» terricola (Ehrb.) In der von Carter beschriebenen Varietät.

Amoeba quadrilineata; es ist gelungen, diese Form längere Zeit auf Agarplatten zu züchten.

Dactylosphaerium radiosum (Ehrb.).
Pelomyxa palustris (Greef).
Entamoeba buccalis (Prow.).
Difflugia globulosa (Dujardin).
» capreolata (Pénard).

Difflugia capreolata (Pénard).
Euglypha alveolata (Dujardin).
Arcella vulgaris (Ehrb.). (Foi encontrado uma vez um individuo que produziu esporios pseudopodicos e as bolhas gazozas com função hidrostatica tipicas).

Euglypha alveolata (Dujardin).
Arcella vulgaris (Ehrb.).
Einmal wurde ein Individuum gefunden, das gerade Pseudopodiosporen und daneben noch die typischen im hydrostatischen Sinne funktionierenden Gasblasen produzierte.

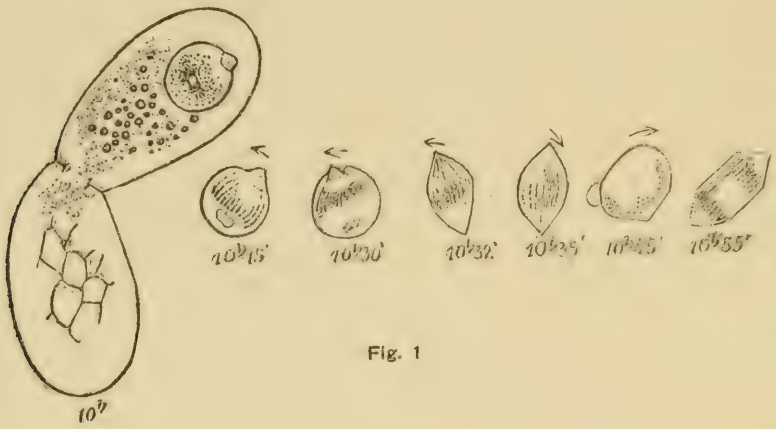


Fig. 1

Trinema enchelys (Ehrb.) (Foi perfeitamente observada no estado vivo a divizão desta forma que se processa no espaço de uma hora e quinze minutos. Neste processo, forma-se um fuzo tipico, talvez de orijem intranuclear, mentes que o corpusculo interno empalidece e se torna mais tarde invizivel ; o estádio de placa equatorial evolve com mais rapidez (oito minutos). No decurso deste processo o nucleo sofre rotações axiais exquizitas cuja evolução aparece mais clara na figura 1 do texto. Por ocazião da divizão dos *testacios* ha tambem diversas correntes de protoplasma sobre as quais chamou primeiro a atenção A. Gruber em seus estudos sobre os processos de divizão da *Euglypha alveolata* e dos rizópodes monotalamicos (Zeitschr. f. wissensch. Zoologie, XXXIV u. XXXV). Weismann no seu estudo « Sobre a duração da vida » 1882, referiu-se a esta mistura rotativa dos dois individuos, rezultantes da divizão, imediatamente antes da separação definitiva e estabeleceu a teze que as duas porções segmentais dos protistas têm constituição

Trinema enchelys (Ehrb.).
Es wurde die Teilung dieser Form, die 1 Std. 15 Min. in Anspruch nahm, genauer während des Lebens verfolgt. Bei diesem Prozess wird eine typische Spindel (wohl intranuklearen Ursprungs) gebildet, wobei der Innenkörper abblasst und später unsichtbar wird ; am raschesten wird das Stadium der Aequatorialplatte durchlaufen (8 Minuten). Der Kern führt im Laufe dieser Prozesse eigenartige Achsenrotationen aus, deren Verlauf am besten aus der Textfigur 1 zur ersehen ist. Bei der Teilung der Testazeen finden auch im Protoplasma allerlei Strömungen statt, auf die zuerst A. Gruber bei seinen Studien über den Teilungsvorgang von *Euglypha alveolata* und der monothalamen Rhizopoden (Zeitschr. f. wissenschaftl. Zoologie, XXXV und XXXIV) die Aufmerksamkeit gelenkt hatte. Weismann berief sich in seinem Vortrag « Ueber die Dauer des Lebens 1882 » gerade auf diese Rotationsmischung der Substanzen beider Teilungsindividuen knapp vor der definitiven Trennung und stellte die These auf, dass

identica não se podendo falar de morte entre estes seres. « A continuidade da vida é conservada de forma identica »).

Centropyxis aculeata (Stein).
Microgromia socialis (Hertw. e Less.)

II. HELIOZOA.

Rhaphidiophrys elegans (Hertw. e Less.).

III. FLAGELLATA.

Monadina :

Monas vivipara (Ehrb.). Num cisto foram encontrados numerozos flajelados diminutos em maior atividade (esporogonia?).

Dendromonadina :

Anthophysa vegetans (Buetschli).

Bicoecina :

Poteriodendron petiolatum (St.)

Choanoflagellata :

Salpingoeca amphoridium (J.—Cl.).

Spongomonadina :

Rhipidodendron splendidum (St.).

Bodonina :

Bodo saltans (Ehrb.).
» caudatus (St.)

Polymastigina :

Trepomonas rotans (Kl.).

Euglenoidina :

Euglena viridis (Ehrb.).
» gracilis (Kl.).
Trachelomonas armata (St.).
» volvocina (Ehrb.).
» hispida (Perty).
Phacus pleuronectes (Netzsch).
» variedade sem côr.
Astasia margaritifera (Schmarda).
Menoidium pellucidum (Perty).
Peranema trichophorum (Ehrb.—St.)
Petalomonas steini (Kl.).
Entosiphon sulcatum (Duj.).

zunächst die beiden Teilstücke niederer Protisten jedesmal innerlich *gleich* veranlagt sind, sodass man bei den niederen Protisten von einem Tod gar nicht reden kann. « Die Kontinuität des Lebens wird in *gleicher* Form gewahrt ».

Centropyxis aculeata (Stein).
Microgromia socialis (Hertw. e Less.)

II. HELIOZOA.

Rhaphidiophrys elegans (Hertw. e Less.).

III. FLAGELLATA.

Monadina :

Monas vivipara (Ehrb.). In einer Zyste wurden zahlreiche winzige Flagellaten in lebhaftester Bewegung gefunden (Sporogonie?)

Dendromonadina :

Anthophysa vegetans (Buetschli).

Bicoecina :

Poteriodendron petiolatum (St.).

Choanoflagellata :

Salpingoeca amphoridium (J.—Cl.).

Spongomonadina :

Rhipidodendron splendidum (St.).

Bodonina :

Bodo saltans (Ehrb.).
» caudatus (St.)

Polymastigina :

Trepomonas rotans (Kl.).

Euglenoidina :

Euglena viridis (Ehrb.)
» gracilis (Kl.).
Trachelomonas armata (St.).
» volvocina (Ehrb.).
» hispida (Perty).
Phacus pleuronectes (Netzsch).
» farblose Varietät.
Astasia margaritifera (Schmarda).
Menoidium pellucidum (Perty).
Peranema trichophorum (Ehrb.—St.)
Petalomonas steini (Kl.).
Entosiphon sulcatum (Duj.).

Chrysomonadina :

Ochromonas mutabilis (Klebs).

Cryptomonadina :

Cyathomonas truncata (St.).

Chilomonas paramæcium (Ehrb.). Nesta forma acompanhei a divizão do cariozoma do nucleo, já em parte descrita por Awerinzew (Zool. Anzeiger XXXI, 1906-07). O cariozoma aumenta de volume, tornando-se o centro um tanto mais claro e divide-se em duas partes observando-se uma dislocação do eixo. A zona periferica do nucleo (nucleo pericariozomico) divide-se por estrangulamento (Fig. 2, b e c). o cariozoma contem um centriolo duplo e uma zona periferica de cromatina (Fig. 2, a).

Chrysomonadina :

Ochromonas mutabilis (Klebs).

Cryptomonadina :

Cyathomonas truncata (St.).

Chilomonas paramaecium (Ehrb.)

Bei der letzten Form wurde die Teilung des Karyosoms des Hauptkerns, die bereits Awerinzew (Zoolog. Anzeiger XXXI. 1906-7) teilweise beschrieben hatte, verfolgt. Das Karyosom schwillt an, lichtet sich zentral etwas auf und zerteilt sich in zwei Teile, wobei eine Verschiebung der Achse zu bemerken ist. Die periphere Zone des Kernes (perikaryosomaler Kern) wird einfach zerschnürt. (Fig. 2. b und c). Das Karyosom selbst enthält ein Centriol in Diploform und eine periphere Chromatinzone (Fig. 2 a).

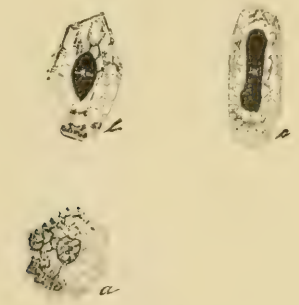


Fig. 2

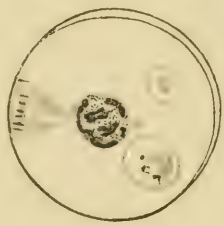


Fig. 3

Chlamydomonadina :

Polytoma uvella (Ehrb.).

Volvocina :

Gonium pectorale (O. F. M.)

Peridiniacea :

Glenodium cinctum (Ehrb.).

IV. CILIATA.

Holotricha :

Enchelina :

Enchelys farcimen (Ehrb.).

Prorodon teres (Ehrb.). Nesta forma observei frequentemente divizões binarias

Chlamydomonadina :

Polytoma uvella (Ehrb.).

Volvocina :

Gonium pectorale (O. F. M.)

Peridiniacea :

Glenodium cinctum (Ehrb.).

IV. CILIATA.

Holotricha :

Enchelina :

Enchelys farcimen (Ehrb.).

Prorodon teres (Ehrb.).

dentro do cisto. O aparelho em forma de nassa cinde-se verticalmente. A cromatina reune-se na periferia do nucleo em formas parecidas com cromozomios (Fig. 3).

Lacrymaria olor (O. F. M.).
Coleps hirtus (Ehrb.)
Didinium nasutum (St.). (Formas livres e cistos).
Mesodinium acarus (St.).

Trachelina :

Lionotus anser (O. F. M.).
Trachelius ovum (Ehrb.).

Chlamydodonta :

Nassula elegans (Ehrb.).
Chilodon uncinatus (Ehrb.).
» cucullus (O. F. M.).

Chylifera :

Leucophrys patula (Ehrb.).
Glaucoma scintillans (Ehrb.).
Frontonia leucas (Ehrb.).
Ophryoglena fava (Ehrb.).
Colpidium colpoda (St.).
Colpoda cucullus (Ehrb.).
« steini (Maupas).

Com cistos de Colpoda foram feitas varias experiencias. O conteúdo protoplasmatico dos cistos é sempre *liquido* porque os granulos de excreção, quando prezentes, como tambem outros granulos movem-se havendo pressão (a) ; o nucleo pode ser deslocado (b) e se o cisto fôr esmagado, o conteúdo assume a forma de gotas, propria de liquidos livres (c). Observou-se tambem frequentemente no interior a formação de excavações do protoplasma. Nos cistos de multiplicação, tambem, com emprego de pressão de intensidade variada, foram feitas experiencias de deslocação do conteúdo (nucleo, granulos), para provar que no interior *não* havia *estruturas intimas* especiais, necessarias para o *dezenvolimento normal*. Infelizmente não foram estas experiencias decizivas porque os cistos nas primeiras fazes de divizão são

Bei dieser Form sind häufig Zweiteilungen in der Zyste beobachtet worden. Der Reusenapparat spaltet sich senkrecht durch. Im Kern sammelt sich peripher das Chromatin zu chromosomähnlichen eigenartigen Figuren an. (Fig. 3).

Lacrymaria olor (O. F. M.).
Coleps hirtus (Ehrb.).
Didinium nasutum (St.) freie Formen und Zysten.
Mesodinium acarus (St.).

Trachelina :

Lionotus anser (O. F. M.).
Trachelius ovum (Ehrb.).

Chlamydodonta :

Nassula elegans (Ehrb.).
Chilodon uncinatus (Ehrb.).
» cucullus (O. F. M.).

Chylifera :

Leucophrys patula (Ehrb.).
Glaucoma scintillans (Ehrb.).
Frontonia leucas (Ehrb.).
Ophryoglena fava (Ehrb.).
Colpidium colpoda (St.).
Colpoda cucullus (Ehrb.).
» steini (Maupas).

Mit Colpodazysten wurden verschiedene Versuche angestellt. Der Protoplasmainhalt der Zysten ist stets *flüssig*, in ihnen führen die eventuellen Exkretkörnchen und Granula bei Druck Bewegungen aus (a.), der Kern kann verlagert werden (b), während der Inhalt beim Zerdrücken der Zyste die Tropfengestelt freier Flüssigkeiten (c) annimmt. Im Innern ist dann vielfach ein Cavulationsprozess des Protoplasmas beobachtet worden. Bei den Vermehrungszysten sind bei Anwendung verschiedenfach variierten Druckes Verlagerungsexperimente des Inhalts (Kern, Granula) ausgeführt worden, zum Beweis, dass im Innern *keine* besonders eingerichteten *Intimstrukturen*, die zu einer normalen Entwicklung notwendig sind, vorhanden seien. Leider sind die Versuche nicht ganz eindeutig, da die Zysten

muito delicados perecendo facilmente. Por pressão durante pouco tempo foi possivel obter que o primeiro sulco de divizão no momento do começo dezaparecesse outra vez. O nucleo em alguns cazos ficou deslocado e uma vez realmente deformado; assim mesmo, passado o efeito de choque, depois de algum tempo, algumas vezes, a divizão normal foi terminada.

Loxocephalus granulosus (KENT). O orificio oral desta forma só tinha uma pequena membrana ondulante; na extremidade anterior obvervaram-se varias series de cerdas partindo da boca em direção lijeiramente obliqua.

PARAMAECINA :

Paramaecium caudatum (EHRB.) em infuzões.

Paramaecium bursaria (FOCKE) em infuzões.

UROCENTRINA :

Urocentrum turbo (EHRB.).

PLEURONEMINA :

Lambadion bullinum (O. F. M.).
Pleuronema chrysalis (EHRB.).
Cyclidium glaucoma (EHRB.).

PLAGIOSTOMINA :

Blepharisma lateritia (ST.). Foi cultivado durante algum tempo em agua de condensação de agar, observando-se por dentro do corpo celular lijeiras correntes. Do lado ventral, na rejião do poro do vacuolo, vê-se um logar mais claro, não pigmentado, onde falta a estriação do corpo.

Spirostomum teres (CL. e L.).
» ambiguum (EHRB.).

STENTORINA :

Stentor polymorphus (EHRB.).
» viridis.

HYPOTRICHA :

Oxytrichina:

Urostyla flavicans (WRZESN.).
Onychodroma grandis (ST.).

aus den ersten Teilungsstadien recht empfindlich sind und leicht zugrunde gehen. Durch kurze Zeit währenden Druck konnte die erste, eben einsetzende Teilungsfurche rückgängig gemacht werden. Der Kern wurde in einzeln Fällen verlagert, einmal wirklich deformiert, trotzdem wurde die normale Teilung nach Ueberwindung der Shokwirkung nach einiger Zeit in mehreren Fällen zu Ende geführt.

Loxocephalus granulosus (KENT.).

Die Mundöffnung dieser Form besass nur eine kleine undulierende Membran; am Vorderende wurden mehrere Reihen von leicht schief vom Munde her verlaufenden Borsten beobachtet.

PARAMAECINA :

Paramaecium caudatum (EHRB.) in Infusionen.

Paramaecium bursaria (FOCKE) in Infusionen.

UROCENTRINA :

Urocentrum turbo (EHRB.).

PLEURONEMINA :

Lambadion bullinum (O. F. M.).
Pleuronema chrysalis (EHRB.).
Cyclidium glaucoma (EHRB.).

PLAGIOSTOMINA :

Blepharisma lateritia ST.) konnte in Agar-Kondenswasser längere gezüchtet werden. Im Innern des Zellkörpers sind leichte Strömungen beobachtet worden. Ventral in der Gegend der Vacuolenporus bemerkt man eine lichte Stelle, die nicht pigmentiert ist und an der auch die Körperstreifung aussetzt.

Spirostomum teres (CL. und L.).
» ambiguum (EHRB.).

STENTORINA :

Stentor polymorphus (EHRB.).
» viridis.

HYPOTRICHA :

Oxytrichina:

Urostyla flavicans (WRZESN.).
Onychodroma grandis (ST.).

Stylonychia mytilus (O. F. M.).
» pustulata (Ehrb.).
Aspidisca spec.

Peritricha :

Vorticellina :

Trichodina Pediculus (Ehrb.).
Vorticella microstoma (Ehrb.).

Numa viajem pelo Estado de S. Paulo (que me foi dado realizar em companhia dos Srs. Drs. Lutz, Neiva, Soledade e Faria) tive ensejo de fazer varias vezes a pesca do plancton do Rio Tiété. A agua deste rio é turva, côr de café e depozita perto de Itapura (onde na marjem direita a corrente importa em ca. de 0,24 metros por segundo) 2 a 2,5 centimetros cubicos de lodo fino de côr parda, numa rede de plancton com a qual se pescava durante cinco minutos. A sua agua distingue-se pela propriedade que as bolhas formadas de modo qualquer se conservam por muito tempo, juntando-se na marjem em forma de escuma amarelada. Couza semelhante observou Karl von den Steinen (1887-1888) no Culizeu (Kuliheu, Kuliseu) : « a escuma produzida pelos remos conserva-se sobre a agua calma formando uma estrada ; as bolhas que não são disturbadas por ondas permanecem sobre a agua e pouco a pouco o vento as leva á margem ». (Unter den Naturvoelkern Zentral-Brasiliens, Berlin, Reimer, 1897, pj. 52-53). Esta rezistencia da escuma explica-se pela suspensão do lodo e pela substancia organica, existindo duas *pontederiaceas* em grande numero que são fragmentados nos saltos e cachoeiras numerozas. Pode-se imital-a juntando á agua um pouco de saponina e flores de enxofre e produzindo escuma pela ajitação. Nas poças perto do salto de Itapura encontrou-se junto com colonias interessantes de *Conochilus volvox* Ehrb. os seguintes protozoarios :

Difflugia pyriformis (Perty).
» constricta (Ehrb.).
» urceolata (Carter).

Stylonychia mytilus (O. F. M.)
» pustulata (Ehrb.).
Aspidisca spec.

Peritricha :

Vorticellina :

Trichodina Pediculus (Ehrb.).
Vorticella microstoma (Ehrb.).

Auf einer Reise durch S. Paulo, die ich mit Drs. Lutz, Neiva, Soledade und Faria unternehmen durfte, hatte ich Gelegenheit, wiederholt im Flusse *Tiété* Plankton zu fischen. Das Wasser dieses Flusses ist trübe, kaffeebraun und sedimentiert in der Nähe von *Itapura*, wo der *Tiété* am rechten Ufer an der Stelle, wo das Plankton gefischt wurde mit der Geschwindigkeit von ca. 0,24 Meter pro Sekunde fliesst, bei 5 Minuten lang ausdauerndem Fischen mit einem Planktonnetz 2—2,5 ccm eines feinen, braunen Schlammes. Für sein Wasser ist besonders die Erscheinung charakteristisch, dass einmal irgendwie entstandene Blasen lange Zeit *erhalten* bleiben und sich am Ufer in Form eines gelblichen Schaumes ansammeln. Etwas ähnliches beobachtete Karl von den Steinen (1887—1888) am Kulisehu (Kuliheu, Kuliseu) : « Der Schaum des Ruderschlages erhält sich auf stiller Flut in einer Strasse ; durch keinen Wellenschlag zertrümmert bleiben die Luftblasen auf dem Wasser stehen und werden vom Winde allmählich ans Ufer getrieben ». (Unter den Naturvölkern Zentral-Brasiliens, Berlin, Reimer, 1897, p. 52—53). Diese Schaumresistenz ist wohl aus der reichen *Schlammsuspension* des Wassers einerseits sowie der *organischen* Substanz (es kommen zwei *Pontederiaceen* reichlich vor, die in den zahlreichen Cachoeiras und Saltos zertrümmert werden) andererseits zu erklären. Man kann sie nachahmen, indem man dem Wasser etwas Saponin und Schwefelblumen zusetzt und das ganze durch Schütteln verschäumen lässt. In den Tümpeln in der Nähe des Itapurafalles wurden neben interessanten Kolo-

Arcella vulgaris (Ehrb.)
» costata (»)
Centropyxis aculeata (St).
Nebella collaris (Ehrb.).
Gonium pectorale (O F Mueller).
Trachelomonas spec.
Coleps hirtus (Ehrb.).
Stentor polymorphus (Ehrb.).
Carchesium polypinum (Ehrb.).

Na proximidade do salto encontrei em 10 de Janeiro 1909 :

Arcella costata (Ehrb.).
Lacquereusia spiralis (Ehrb).
Difflugia lobostoma (Leidy).
» pyriformis (Perty).
» coronata (Wallich).
Euglypha spec.
Anthophysa vegetans (Buetschli).
Trachelomonas armata (Ehrb.).
Urostyla flavicans (Wrzesn.).
Oxytricha spec.

Em 15 de Janeiro de 1909 foram pescadas no Tiété as formas seguintes :

Trinema enchelys (Ehrb.).
Arcella vulgaris (Var.).
Centropyxis aculeata (St.).

Achei tambem :

Amphipleura pellucida (Kg.) e cascas de Pinnularia, Closterium e Diatoma.

Tanto no Canal do Inferno como no salto de Avanhandava encontram-se mós parecidas com as conhecidas com o nome : « Gletschermuehlen », nas quais se encontraram entre espirojiras as formas seguintes :

Centropyxis aculeata (St.).
Trinema lineare (Pénard).
Lacquereusia spiralis (Pénard).
Difflugia avellana (Pénard).
» lebes (Pénard).
Euglypha brachiata (Leidy).
Euglena viridis (Ehrb.).
Balladina parvula (Kowal.).
Vorticella spec.

As poças na vizinhança imediata do Tiété, ao contrario do que se dá na Europa em aguas semelhantes, só continham nien von *Conochilus volvox* (Ehrb.) folgende Protozoenformen gefunden :

Difflugia pyriformis (Perty).
» constricta (Ehrb.).
» urceolata (Carter).
Arcella vulgaris (Ehrb.).
» costata (»)
Centropyxis aculeata (St).
Nebella collaris (Ehrb.).
Gonium pectorale (O. F. Mueller).
Trachelomonas spec.
Coleps hirtus (Ehrb.).
Stentor polymorphus (Ehrb.).
Carchesium polypinum (Ehrb.).

In der Nähe des Falles selbst (10—1—09) :

Arcella costata (Ehrb.).
Lacquereusia spiralis (Ehrb).
Difflugia lobostoma (Leidy).
» pyriformis (Perty).
» coronata (Wallich).
Euglypha spec.
Anthophysa vegetans (Buetschli)
Trachelomonas armata (Ehrb.).
Urostyla flavicans (Wrzesn.).
Oxytricha spec.

Im Tiété wurden am 15—1—09 folgende Formen gefischt :

Trinema enchelys (Ehrb.).
Arcella vulgaris (Var.).
Centropyxis aculeata (St.).
ferner Amphipleura pellucida (Kg.), Schalen von Pinnularia, Closterium und Diatoma.

Sowohl am Canal do Inferno, als auh bei dem Fall von Avanhandava kommen sog. Steinmühlen (vergl. Gletschermühlen) vor, in denen zwischen Spirogyren folgende Formen beobachtet worden sind :

Centropyxis aculeata (St.).
Trinema lineare (Pénard).
Lacquereusia spiralis (Pénard).
Difflugia avellana (Pénard).
» lebes (Pénard).
Euglypha brachiata (Leidy).
Euglena viridis (Ehrb.).
Balladina parvula (Kowal.).
Vorticella spec.

poucos micrófitos dos quais se observaram apenas algumas *protococaceas* e *desmidiaceas* como reprezentantes carateristicos do helioplancton. De outro lado os testacios se salientavam tanto pelo tamanho, como pelo numero. (Pela teoria de HERTWIG devia ter-se esperado nestas poças razas e aquecidas pelo sol pequenas formas de agua morna, como tambem supõe AWERINZEW (Arch. f. Protistenk. Bd. VIII 1907, pj. 112-113). Nestas poças bem havia abundancia de substancias humozas em suspensão que impediam pela quantidade a penetração da luz tão necessaria ao dezenvolvimento de micrófitos.

R. MONTI (Annal. Biol. Lac. Vol. I, 1906) indica o historico do povoamento dos lagos alpinos de modo que apareceram primeiramente *algas* e *diatomeas* e sómente depois *rizopodes* e *testacios*; assim estas poças do Tiété perto de Itapura teriam alcançado a segunda faze na géneze do plancton. Os *rotatorios* e *ictidios* nelles eram pouco numerozos.

Os *testacios* destas poças, encontradas imediatamente ao lado do Tiété e reprezentando assim, até certo ponto, os leitos antigos, tambem davam o plancton eupotamico deste rio turvo, emquanto que os micrófitos reprezentam o plancton ticopotamico que, por cauza da pouca luz, muitas vezes morre logo. Ao *pseudoplancton* do Tieté pertencem varios restos de plantas e principalmente fragmentos de agulhas hialinas, bastante singulares, provavelmente de natureza cristalina e de orijem vejetal.

Segundo SCHEWIAKOFF conhecem-se do Brazil sómente duas formas de protozoarios com vida livre:

Trinema enchelys (EHRB.).

Difflugia aculeata (EHRB.).

que ambas foram descritas por EHRENBERG nos: Monatsberichte d. k. Preuss. Akad. d. Wissenschaften, Berlin 1841, und Abhandl. d. Berl. Akad. Physik. Cl. 1841.

Die Tümpel in der unmittelbaren Nähe des Tiété führten im Gegensatz zu ähnlichen Wasseransammlungen Europas nur *wenige* Mikrophyten, von denen nur einige Protococcaceen und Desmidiaceen als charakteristische Vertreter des Helioplanktons beobachtet worden sind. Dagegen fielen die Testazeen sowohl in Bezug auf ihre Grösse (nach der Theorie von HERTWIG würden wir in den flachen, *warmen* Tümpeln kleine Warmwasserformen erwarten, wie auch AWERINZEW (Arch. f. Protistenk. VIII. Bd. 1907, p. 112-113) vermutet), als auch mit Rücksicht auf ihre Menge auf. In den Tümpeln kamen wohl reichlich suspendierte *humöse* Substanzen vor, behinderten aber durch ihre Reichhaltigkeit das Eindringen des Lichtes, das für eine Entfaltung der Mikrophytenflora unerlässlich ist.

R. Monti (Annal. Biol. Lac. Bd. 1 1906) stellt die Besiedelungsgeschichte der Alpenseen in der Weise dar, dass zuerst Algen und Diatomeen, dann erst Rhizopoden u. z. Testazeen auftreten; demnach hätten diese Tiété-Tümpel in der Nähe von Itapura die zweite Etappe in der Planktongenese erreicht. Rotatorien und Ichthydien waren in ihnen sehr spärlich.

Die Testazeen dieser Tümpel, die zum Teil in der unmittelbarsten Nähe des Tieté liegen und so in einem gewissen Sinne dessen « *Altwässer* » darstellen, liefern auch das *eupotamische* Plankton dieses trüben Stromes, während die Mikrophyten das *tychopotamische* Plankton darstellen, das wegen der ungünstigen Lichtverhältnisse vielfach bald abstirbt. Zum *Pseudoplankton* des Tiété gehören dann die verschiedenen Pflanzenreste, besonders aber eigenartige hyaline Nadelfragmente, die wohl pflanzlichen, kristallinischen Ursprungs sind.

Nach SCHEWIAKOFF sind aus Brasilien bis jetzt nur folgende zwei freilebende Protozoenformen bekannt:

Trinema enchelys (EHRB.).

Difflugia aculeata (EHRB.).

Beide wurden von EHRENBERG (Monatsberichte d. k. Preuss. Akad. d. Wis-

Todas as formas aqui descritas *tambem se encontram na Europa*, e assim este estudo faunistico curto e incompleto seria tambem uma *contribuição á doutrina do habitat cosmopolitico de todos os protozoarios de vida livre*, defendida por BUETSCHLI e SCHEWIAKOFF (*Ueber die geographische Verbreitung der Suesswasserprotozoen — Mém. de l'Acad. Imper. d. St. Petersb. XLI, N. 8, 1893*). Todavia precizamos ainda de muita cautela quando tiramos estas concluzões a respeito da geografia animal, visto que a fauna do mundo em relação aos protozoarios é imperfeitamente conhecida e tambem as definições antigas dos protozoarios de agua doce frequentemente são pouco exatas.

Abril de 1910.

senschaften, Berlin 1841 und Abhandl. d. Berl. Akad. Physik. Cl. 1841) beschrieben.

Alle hier angeführten Formen kommen *auch in Europa* vor und es wäre demnach diese kurze und unvollständige faunistische Studie mit einem *Beitrag für die Lehre von dem kosmopolitischen Vorkommen aller freilebenden Protozoen*, für die BÜTSCHLI und SCHEWIAKOFF (Ueber die geographische Verbreitung der Süsswasserprotozoen, (Mém. de l'Acad. Imp. d. Sc. d. St. Pétersb. XLI, N. 8, 1893) eingetreten sind, zu betrachten. Immerhin müssen wir aber mit derartigen tiergeographischen Schlüssen noch sehr vorsichtig sein, da die Protozoenfaune der Welt noch unvollständig bekannt und die älteren Bestimmungen der Süsswasserprotozoen vielfach ungenau sind.

April 1910.

Sobre a divizão nuclear da Amoeba hyalina Dang.

PELO

Prof. Dr. Max Hartmann

(Do Instituto de Molestias infetuozas de Berlin)

E

Dr. Carlos Chagas

(Chefe de serviço.)

(Estampa 10.)

Ueber die Kernteilung von Amoeba hyalina Dang.

VON

Prof. Dr. Max Hartmann

(Mitglied des Instituts für Infektionskrankheiten in Berlin)

UND

Dr. Carlos Chagas

(Abteilungsvorsteher am Institute.)

(Mit Taf. 10.)

Nas nossas culturas de flajelados obtidas de uma poça no terreno de Manguinhos, a principio, apareceu tambem uma especie de ameba, em grande numero; não lhe pagámos muita atenção não tendo o intento de estudal-a. Todavia, em nossos estudos de flajelados depararam-se nos nossos preparados coloridos alguns estádios interessantes de divizão nuclear parecidos com os reproduzidos por DANGEARD da sua *Amoeba hyalina*; mas, mostrando muito mais pormenores e principalmente centriolos distintos cuja prezença DANGEARD negou. Como nos parecia importante acompanhar o comportamento do centriolo n'uma forma semelhante, quiçá identica á, em que a sua prezença foi contestada, examinámos esta (que em alguns dos nossos preparados era abundantissima) com mais cuidado, verificando que, evidentemente era identica á especie de DANGEARD. Infelizmente, então, a ameba tinha já dezaparecido das nossas culturas, de modo

In unseren Flagellatenkulturen aus dem einen Tümpel von Manguinhos trat anfangs auch eine Amoebenart in grosser Anzahl auf; da wir aber nicht die Absicht hatten, dieselbe zu untersuchen, schenkten wir ihr weiter keine Beachtung. In unseren gefärbten Präparaten stiessen wir jedoch beim Studium der Flagellaten auf einige interessante Kernteilungsstadien, die sehr denen glichen, die DANGEARD von seiner *Amoeba hyalina* gegeben hatte, aber viel mehr Details und vor allem deutliche Centriolen erkennen liessen, deren Vorhandensein DANGEARD in Abrede gestellt hat. Da es uns von Wichtigkeit schien, für eine ähnliche oder eventl. gar dieselbe Form, für die ein Centriol bestritten wurde, dessen Verhalten genau zu verfolgen, so untersuchten wir jetzt diese Form, die sich in einem Teil unserer Präparate in grösster Anzahl fand, genauer, wobei sich herausstellte, dass sie offenbar mit der DANGEARD'schen völlig

que não era mais possivel estudal-a em estado vivo, sobre o qual só podemos dar alguns dados de memoria. DANGEARD tinha descrito a sua forma de material conservado sem têl-a visto em vida.

A ameba viva, mesmo em repouzo, sempre mostra um ectoplasma distinto; o entoplasma era vacuolizado e no seu interior viu-se o nucleo veziculozo com cariozoma esferico. Não podemos dizer se neste o centriolo pode ser visto na ameba viva, visto que não o procurámos. A ameba era muito movel emitindo geralmente pseudopodios estreitos em varias direções quazi como a *Amoeba polypodia*. Na preparação, colorida, como foi descrito no ultimo trabalho, mostra aparencia carateristica como se reconhece tambem nos dezenhos de DANGEARD posto não sejam muito finos. O ectoplasma que quazi se não córa forma zona estreita em redor do entoplasma que aprezenta coloração escura e varios vacuolos (Fig. 2—6). Em nenhuma outra ameba a diferenciação do ecto- e entoplasma se conserva tão bem na preparação córada como nesta.

DANGEARD disse que o primeiro é completamente homojenio; mas nós encontrámos uma estrutura vacuolar muito fina e dificil de se perceber. O entoplasma mostra estrutura vacuolar distinta com alguns vacuolos (nutritivos) maiores e alguns granulos constantes e intensamente córados. Isto e o ectoplasma claro dão á ameba aspeto carateristico, permitindo distinguil-a já com aumento médio dos muitos outros organismos contidos nas preparações.

O nucleo contem um cariozoma bastante grande, cercado de estreita zona de suco nuclear no qual se acham quazi toda a cromatina e plastina. Não se percebe membrana nuclear verdadeira, mas ha um analogo provavelmente de importancia fi-

identisch ist. Leider war aber jetzt die Amoebe in unseren Kulturen verschwunden, so dass wir sie nicht mehr lebend studieren konnten. DANGEARD hatte seine Form nur nach konserviertem Material beschrieben und sie überhaupt nicht im Leben gesehen. Wir können nur nach unseren Erinnerungen einige Angaben machen.

Die Amoebe zeigt im Leben, auch in der Ruhe, stets ein deutliches Ectoplasma; das Entoplasma war vakuolär und im Innern sah man den Kern als Bläschen mit kugeligem Caryosom. Ob das Centriol auch im Leben innerhalb des letzteren wahrzunehmen ist, können wir nicht angeben, da wir nicht darauf geachtet haben. Die Amoebe war äusserst beweglich und sandte gewöhnlich nach verschiedenen Richtungen schmale Pseudopodien aus, etwa nach der Art der *Amoeba polypodia*. In gefärbtenn Präparaten—über die Herstellung derselben siehe die vorhergehehende Arbeit — weist die Amoebe ein charakteristisches Aussehen auf, das sie auch in den etwas rohen Abbildungen von DANGEARD erkennen lässt. Eine schmale Zone des fast völlig ungefärbt bleibenden Ectoplasmas umgibt stets das dunkel gefärbte und von mehreren Vakuolen durchsetzte Entoplasma (Fig. 2—6). Bei keiner anderen bekannten Amoebe bleibt die Differenzierung in Ecto- und Entoplasma in gefärbtem Präparat so deutlich erhalten, wie hier. DANGEARD gab an, dass das erstere ganz homogen sei; wir fanden in ihm eine feine, sehr schwer sichtbare Wabenstruktur. Das Entoplasma ist deutlich wabig gebaut, mit einigen grösseren Vacuolen (Nahrungsvacuolen) und enthält stets eine Anzahl stark färbbarer Körner verteilt. Dadurch, sowie durch das helle Ectoplasma, gewinnt die Amoebe ein sehr charakteristisches Ansehen, und man kann sie schon bei mittlerer Vergrösserung unter den vielen anderen Organismen der Präparate erkennen.

Der Kern besitzt ein ziemlich grosses Caryosom, das fast alles Chromatin und Plastin enthält und von einer schmalen Kernsaftzone umgeben ist. Eine beson-

ziolojica ; o protoplasma é espessado no limite interior, despegando-se nitidamente do interior do nucleo em fórma de membrana. A zona de suco nuclear geralmente não mostra estrutura e contem apenas um pequeno numero de granulos de cromatina derivados do cariozoma como se percebe distintamente nas preparações. E' este ultimo muito compacto, mas, mesmo no nucleo em repouzo mostra distintamente a sua compozição de substancia acromatica (plastina) e de cromatina. Em preparações bem diferenciadas percebe-se distintamente o centriolo no seu interior (Fig. 1 e 7).

Como DANGEARD observou corretamente, a divizão nuclear começa pelo entumecimento do cariozoma (que elle ainda chama nucleolo) e pela sua divizão em varios granulos de cromatina. Já antes o centriolo se divide em forma de halteres (Fig. 8 e 9). Os centriolos filhos então formam saliencia em lados opostos da massa do cariozoma (Fig. 9 e 10). Assim, os varios aspetos se parecem completamente com aquelles que descrevemos para a *Spongomonas* em trabalho anterior (1910). Observa-se, porém, a diferença que já neste estado a membrana nuclear (se fôr permitido chamar assim a delimitação do protoplasma) é dissolvida e o plasma do nucleo se mistura com o protoplasma celular vizinho, formando-se por dissolução ou extensão do componente plastinico do cariozoma zona acromatica homojenia, o começo do fuzo (Fig. 10 e 11). Na maioria dos cazos já então os granulos de cromatina (cromozomios) se dispoem simultaneamente no meio da zona acromatica e em redor da centrodesmoze para formar uma placa equatorial. Outras vezes a membrana e a zona de suco nuclear perzistem até a formação completa dos cromozomios.

O numero dos cromozomios foi estimado por DANGEARD em cerca de doze, não podendo elle fazer uma contajem certa. Em

dere Kernmembran ist nicht zu beobachten, doch kommt eine Membran, die wohl physiologisch von Bedeutung ist, dadurch zustande, dass das Protoplasma an seiner Grenze verdichtet ist und sich gegen das Kerninnere scharf membranartig absetzt. Die Kernsaftzone ist meist strukturlos und enthält nur spärlich Chromatinkörner, deren Abspaltung vom Caryosom in den Präparaten deutlich zu Tage tritt (Fig. 1). Letzteres ist sehr kompakt, lässt aber schon beim ruhenden Kern eine Zusammensetzung aus einer achromatischen Substanz (Plastin) und Chromatin erkennen. Bei gut differenzierten Präparaten sieht man in seinem Inneren deutlich das Centriol (Fig. 1 u. 7).

Die Kernteilung beginnt, wie DANGEARD richtig beobachtet hat, damit, dass das Caryosom (er nennt es noch Nucleolus) sich aufbläht und in eine Anzahl Chromatinkörner zerfällt. Zuvor aber teilt sich in ihm das Centriol hantelförmig (Fig. 8 u. 9). Die Tochtercentriolen treten hierbei an gegenüberliegenden Seiten über die Caryosommasse etwas hervor (Fig. 9 u. 10). Diese Bilder gleichen somit ganz denen, die wir in der Arbeit (1910) für *Spongomonas* beschrieben haben. Zum Unterschiede gegen letztere Form wird jedoch schon meist in diesem Stadium die Kernmembran (wenn man die Abgrenzung des Protoplasmas so nennen darf) aufgelöst, und das Kernplasma mischt sich mit dem umgebenden Zellplasma, wobei durch Auflösung resp. Ausbreitung der Plastinkomponente des Caryosoms eine achromatische homogene Zone, die Spindelanlage, zustande kommt (Fig. 10 u. 12). Gleichzeitig ordnen meist sich jetzt schon die Chromatinkörner (Chromosomen) in der Mitte der achromatischen Zone um die Centrodesmose zur Aequatorialplatte an. Manchmal bleibt aber auch bis zu völliger Ausbildung der Chromosomen die Kernmembran und die Kernsaftzone erhalten (Fig. 11).

Die Zahl der Chromosomen hat DANGEARD auf etwa ein Dutzend angegeben, aber nicht genau zählen können. In einem

faze posterior (nas placas filhas) contou elle seis cromozomios numa preparação bem colorida. Ambos os numeros são errados com veremos, sendo porém o ultimo mais correto. Como verificámos com toda certeza em preparações de hematoxilina férrea bem diferenciadas tanto nas profazes (Fig. 10 e 11) como na placa equatorial e filha sempre existem oito cromozomios. Verificámol-o com muita nitidez nas profazes de uma ameba excecionalmente grande (Fig. 11). Aqui se vê, tambem. ao lado dos cromozomios de tamanho dezigual o centriolo em divizão, fracamente colorido. Não é para admirar que este não fosse visto por DANGEARD, considerando que não tinha preparações de hematoxilina férrea.

Como nas profazes tambem nas meta- e anafazes o numero dos cromozomios pode ser fixado em oito; verdade é que geralmente só se percebem quatro ou seis cromozomios quantos contou DANGEARD n'uma placa filha, mas isto provem da sua dispozição em anél, podendo dois ou quatro ficar encobertos. Porém, em pozição obliqua do fuzo o numero correto pode determinar-se facilmente.

Deixámos ainda de expor a propria formação do fuzo. Partindo do estádio reprezentado na Fig. 12, a divizão do centriolo procede em seguida até ao limite da zona acromatica que então assume a fórma de fuzo (fig. 2 e 11) e mostra estriação muito fina. A centrodesmoze então aparece dissolvida e os proprios centriolos neste estádio se percebem com dificuldade; todavia, a sua prezença pode ser demonstrada por coloração boa. Não observámos a divizão dos cromozomios; depois desta o fuzo se alonga muito aparecendo, então, duas placas filhas, cada uma com oito cromozomios (Fig. 3 e 16). Depois se dá em primeiro lugar o dezaparecimento dos fuzos polares, e as placas polares se con-

gut gefärbten Präparate zählte er bei einem späteren Stadium (bei den Tochterplatten) 6 Chromosomen. Beide Angaben stimmen nicht, wenn auch die letztere Beobachtung, wie wir sehen werden, richtiger ist. Es sind nämlich, wie wir an gut differenzierten Eisenhämatoxylinpräparaten mit Sicherheit feststellen konnten, in den Prophasen (Fig. 10 u. 11), wie in der Aequatorial- und Tochterplatte stets 8 Chromosomen vorhanden. Sehr deutlich konnte dies bei einer abnorm grossen Amoebe in den Prophasen beobachtet werden (Fig. 11). Hier sieht man auch neben den ungleich grossen Chromosomen das schwach gefärbte und in Teilung begriffene Centriol. Dass DANGEARD letzteres entgangen ist, ist nicht zu verwunden, da er keine Eisenhämatoxylinpräparate hatte.

Wie in den Prophasen, so lässt sich auch in den Meta- und Anaphasen die Zahl der Chromosomen auf 8 bestimmen sein (Fig. 13). Wohl erscheinen meist hierbei nur 4 oder 6 wie das DANGEARD für eine Tochterplatte angegeben hat; doch kommt das Chromosomen vorhanden zu daher, dass dieselben ringförmig angeordnet und 4 resp. 2 verdeckt sind. Bei etwas schiefer Lage der Spindel (Fig. 14 u. 15) kann man jedoch leicht die richtige Zahl feststellen.

Nachzuholen ist noch die eigentliche Ausbildung der Spindel. Von dem Stadium der Fig. 12, wird sie in der Weise erreicht, dass die Centriolteilung weiter schreitet bis an die Grenze der achromatischen Zone und diese nun spindelige Gestalt annimmt (Fig. 2 u. 13). Sie zeigt eine äusserst feine Streifung. Die Centrodesmose ist jetzt aufgelöst und auch die Centriolen sind in diesem Stadium schwer wahrzunehmen, doch können sie, bei guter Färbung, stets nachgewiesen werden. Die Spaltung der Chromosomen haben wir nicht beobachtet. Nach der Spaltung streckt sich die Spindel stark in die Länge und man sieht 2 Tochterplatten mit je 8 Chromosomen (Fig. 3 u. 16). Dann verschwinden zunächst die Polkegel, die Tochterplatten verdichten sich zu einem

densam, formando trabecula mais grossa, á qual o centriolo póde aderir como na *Spongomonas* ou se colocar fóra delle (Fig. 4 *a* á esquerda) formando na periferia zona de suco nuclear (Fig. 4).

A parte mediana do fuzo póde ainda ser conservada. Nas anafazes que seguem a cromatina trabecular grossa, geralmente se torna menos compacta, mas esta dispozição dos elementos cromaticos tambem pode datar da formação das placas filhas. Assim, os nucleos filhos em reconstrução podem oferecer aspetos variados (Fig. 5 *a* e *b*, Fig. 6 *a* e *b*). O rezultado é sempre o mesmo, formando-se dos cromozomios e do centriolo novo cariozoma esferico e em redor deste zona de suco nuclear, limitando-se contra o plasma sob o aspeto de membrana.

Como vimos, na divizão o fuzo se alonga muito (Fig. 3 e 4), de modo que os nucleos filhos ficam muito afastados em lados opostos; nas ultimas anafazes começa então a divizão celular por estrangulamento do plasma em direção perpendicular ao eixo da divizão nuclear dezaparecendo o ectoplasma na rejião do estrangulamento. Este se torna mais forte e no mesmo tempo as duas metades se afastam de modo a ser ligadas apenas por uma porção estreita de entoplasma (Fig. 5 e 6). A reconstrução dos nucleos filhos só se torna perfeita depois da separação das celulas filhas.

Todavia, em alguns preparados observámos amebas com dois nucleos de tamanho normal conchegados e, ás vezes, ligados ainda por centrodesmoze (Fig. 17). Estes aspetos provavelmente rezultam de mitoze simplificada e abreviada como Aragão (1909) expoz no caso da *Ameba diplomitotica*.

O processo de divizão nuclear aqui descrito é interessante sob varios pontos de vista. Primeiro, a demonstração de um centriolo, dem das Centriol, wie bei *Spongomonas*, dann aussen noch anliegen kann (Fig. 4 *a* links), und umgeben sich mit einer Kernsaftzone (Fig. 4). Der mittlere Spindelteil kann hierbei noch erhalten bleiben. In den späteren Anaphasen lockert sich das balkenförmige Caryosom meist wieder auf, doch kann auch die lockere Lagerung der Chromatinelemente von den Tochterplatten her noch erhalten sein. So können die sich rekonstruirenden Tochterkerne mannigfaltige Bilder darbieten (Fig. 5 *a* u. *b*, Fig. 6 *a* u. *b*). Das Resultat ist aber immer dasselbe, dass nämlich aus den Chromosomen und dem Centriol wiederum ein kugeliges Caryosom wird, um das sich eine Kernsaftzone ausbildet, gegen die sich das Plasma membranartig abgrenzt.

Wie wir gesehen, streckt sich bei der Teilung die Spindel sehr in die Länge (Fig. 3 u. 4), so dass die Tochterkerne an entgegengesetzten Seiten weit von einander zu liegen kommen, und in den letzten Anaphasen setzt dann auch die Zellteilung ein, indem sich quer zu Kernteilungsachse das Plasma einschnürt, wobei das Ectoplasma an diesen Einschnürungsstellen verschwindet. Dieselben werden tiefer, gleichzeitig rücken die Tochterhälften auseinander, bis sie nur noch durch eine schmale Brücke von Entoplasma zusammenhängen (Fig. 5 u. 6). Die Rekonstruktion der Tochterkerne wird erst in den geteilten Tochterzellen zu Ende geführt.

In einigen Präparaten beobachteten wir jedoch Amoeben mit zwei schon normal grossen Kernen dicht neben einander, die in manchen Fällen sogar noch durch eine Centrodesmose verbunden waren (Fig. 17). Diese Bilder dürften wie bei der *Amoeba diplomitotica* nach Aragão (1909) durch eine einfachere, abgekürzte Mitose zustande gekommen sein.

Der hier beschriebene Kernteilungsvorgang ist in mehrfacher Hinsicht von Interesse. Zunächst ist es von Wichtigkeit, dass ein Centriol nachgewiesen wurde. Neuerdings haben Hartmann (1908) und sein Schüler Naegler

triolo é importante. Recentemente HARTMANN (1908) e o seu dicipulo NAEGLER (1909) mostraram que em todas as amebas por elles examinadas ha um centriolo incluido no cariozoma. Este fato foi depois verificado por WERNER na *Entamoeba histolytica* (1908), ARAGÃO na *Amoeba diplomitotica* (1909), v. JANICKI na *E. blattae* e VON WASIELEWSKI e HIRSCHFELD nas amebas *limax* (1909). De outro lado em trabalhos executados tambem por metodos modernos WENYON (1907) na *E. muris* e DOBELL na *E. ranarum* não mencionam o fato. Todavia observações repetidas de HARTMANN mostraram tambem nestas especies a prezença constante de um centriolo no interior do cariozoma. A concepção já exposta no trabalho de NAEGLER que no cariozoma das amebas e em geral dos protozoarios a prezença de centriolo forma regra geral pode ser hoje considerada como fato estabelecido qual expuzémos já no trabalho sobre flajelados publicado no faciculo precedente destas «Memorias». O proprio fato que nesta forma onde um protozoolojista tão experimentado como DANGEARD negou diretamente a prezença de um citocentro, este foi encontrado no cariozoma, sendo tambem verificado o seu papel na divizão nuclear, é da maior importancia para apoiar nosso modo de ver, sujerindo que, provavelmente, em muitos outros cazos, especialmente em plantas, os rezultados negativos, quanto á prezença de centriolos, se transformarão mais tarde em pozitivos.

No estudo sobre flajelados (1910) já expuzemos minuciozamente a filojenia da duplicidade dos nucleos (HARTMANN e v. PROWAZEK 1907). Para as amebas já NAEGLER indicou sucintamente como a evolução, principiando com simples nucleo de cariozoma sem nucleo exterior (amebas *limax*) chega a tipos nucleares nos quais o material fornecedor dos cromozomios sempre se acha no nucleo exterior (*Amoeba diploidea*). Desta ultima especie ARAGÃO (1909) gezeigt, dass bei allen von ihnen untersuchten Amoeben (circa 12 Arten) ein Centriol im Caryosom eingeschlossen ist. Diese Angaben wurden dann von WERNER (1908) für *Entamoeba histolytica*, ARAGÃO (1909) für *Amoeba diplomitotica*, v. JANICKI für *E. blattae* und von WASIELEWSKI und HIRSCHFELD (1909) für *Limax*-Amoeben bestätigt. Dagegen ist in den ebenfalls mit dem modernen Methoden ausgeführten Arbeiten von WENYON (1907) über *E. muris* und DOBELL über *E. ranarum* nichts davon angegeben. Nach unveränderlichen Beobachtungen von HARTMANN ist aber auch bei diesen Arten stets ein Centriol im Caryosom vorhanden. Die schon in der Arbeit von NAEGLER vertretene Auffassung, dass ganz allgemein im Caryosom der Amoeben (und Protozoen überhaupt) ein Centriol sich findet, kann wie in der vorangehenden Flagellatenarbeit schon ausgeführt wurde, nun als feststehende Tatsache gelten. Gerade der Umstand, dass hier bei einer Form, bei der von einem so bewährten Protistenforscher wie DANGEARD ein Cytocentrum strikte in Abrede gestellt war, ein solches im Caryosom aufgefunden und sein Verhalten bei der Kernteilung klargelegt werden konnte, fällt für unsere Auffassung sehr in die Wagschale und legt den Gedanken nahe, dass auch in vielen anderen Fällen, speciell bei Pflanzen, die negativen Angaben über Centriolen sich noch in positive umwandeln werden.

In unserer Flagellatenarbeit (1910) haben wir schon eingehend die Phylogenie der Kernstruktur und Mitose, sowie der Doppelkernigkeit (HARTMANN und v. PROWAZEK 1907) auseinander gesetzt. Für die Amoeben hat NAEGLER schon kurz darauf hingewiesen, wie aus einem einfachen Caryosomkerne ohne Aussenkern (*Limax*amoeben) die Entwicklung bis zu Kerntypen gelangt, bei denen das die Chromosomen liefernde Material stets im Aussenkern bleibt (*Amoeba diploidea*). Eins der schönsten Beispiele der letzten Art hat soeben ARAGÃO mit seiner *Amoeba diplomitotica* kennen gelernt, die zugleich

acaba de comunicar um dos mais bonitos exemplos na sua *Amoeba diplomitotica*, dando no mesmo tempo uma demonstração excelente de binucleidade por incluzão (Hartmann *e* v. Prowazek 1907). Dezenvolvimento em outra direção se vê na *Amoeba hyalina*; como nas amebas *limax*, todo o material generativo é contido ainda no cariozoma. Os granulos destacados do cariozoma e aparecendo no nucleo exterior são puramente vejetativos (troficos) e toda a figura de mitoze se forma de material do cariozoma. Mas o tipo de mitoze alcançado é muito superior; a componente locomotriz do cariozoma aprezenta-se como fuzo acromatico com simples centriolo nos polos; as calotas polares de natureza nuclear (nucleos locomotores), como existem nas amebas *limax* segundo Vahlkampf, Hartmann e v. Prowazek (1907) e Naegler (1909), não existem mais. A componente locomotriz (nucleo) já se acha reduzida a um fuzo central e centriolo, como na maioria das celulas de metazoarios, embora se trate de nucleo acariozomico, aliaz primitivo. Neste ponto temos gráu de evolução completamente igual ao da *Spongomonas* na serie dos flajelados cuja mitoze tem a maior similhança com a da *Amoeba hyalina*. Do outro lado, na evolução dos cromozomios a nossa ameba já fez um passo para diante, visto que estes já aparecem separados e se dividem em metades iguais na ocazião da divizão nuclear. O mesmo nivel é ocupado pela divizão nuclear da *Amoeba vespertilio* examinada por Doflein que tambem evolve de modo muito semelhante no cariozoma. De outro lado o nucleo se torna mais complicado porque nelle existe um nucleo vejetativo externo, bastante dezenvolvido como na *Entamoeba tetragena* e na *E. testudinis* descrita no trabalho dum de nós (Hartmann 1910). Nega tambem a prezença dos centriolos que não obstante estão figurados nos seus dezenhos como já mostrou Naegler.

Novembro de 1909.

eine treffliche Illustration der in einandergeschachtelten Doppelkernigkeit (Hartmann u. v. Prowazek 1907) liefert. Die *Amoeba hyalina* zeigt dagegen eine Entwicklung in anderer Richtung; wie bei *Limax*-Amoeben ist noch alles generative Material im Caryosom enthalten. Die im Aussenkern auftretenden, sich vom Caryosom abschnürenden Körner sind rein vegetativ (trophisch) und die ganze Mitosefigur baut sich nur aus dem Caryosommaterial auf. Aber der Typ der Mitose, der erreicht wird, ist ein bedeutend höherer; die lokomotorische Komponente des Caryosoms stellt sich nur als eine achromatische Spindel mit einfachem Centriol an den Polen dar; die kernartigen Polkappen (lokomotorische Kerne), wie sie sich bei *Limax*amoeben nach Vahlkampf, Hartmann und v. Prowazek (1907) und Naegler (1909) finden, sind nicht mehr vorhanden. Die lokomotorische Komponente (Kern) ist schon, wie bei den meisten Metazoenzellen, auf Centralspindel und Centriole reduziert und das bei einem sonst primitiven Caryosomkern. In diesem Punkte haben wir hier eine völlig gleiche Entwicklungsstufe, wie in der Flagellatenreihe bei *Spongomonas*, mit deren Mitose die von Amoeba hyalina die grösste Aehnlichkeit hat. Dagegen ist in der Ausbildung der Chromosomen gleichfalls noch ein weiterer Schritt bei unserer Amoebe getan, indem dieselben schon gesondert sind und sich bei der Teilung halbieren. Auf gleicher Höhe steht etwa die von Doflein untersuchte Kernteilung von *Amoeba vespertilio*, die sich ebenfalls und in ähnlicher Weise ganz am Caryosom abspielt. Doch ist der Kern dadurch wiederum komplizierter, als bei ihm, wie etwa bei *Entamoeba tetragena* und in *E. testudinis* (Hartmann 1910), ein sehr stark entwickelter vegetativer Aussenkern vorhanden ist. Doflein bestreitet zwar ebenfalls das Vorhandensein von Centriolen, doch hat er sie selbst abgebildet, worauf schon Naegler hingewiesen hat.

November 1909.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 10.

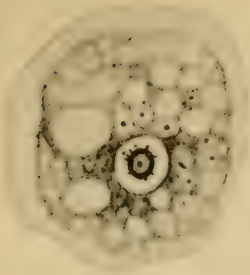
Todas as figuras se referem á *Amoeba hyalina* DANG. e foram dezenhadas ao nivel da meza de trabalho com o aparelho para dezenhar de ABBE'. Aumento : Fig. 1—6 1600 vezes (Zeiss obj. apocrom. 2mm, e oc. comp. 8), Fig. 7—17 3700 vezes (Zeis, ob. apocrom. 2mm, oc. comp. 18).

Fig. 1. Forma vejetativa ; despegamento de granulos cromaticos do cariozoma.
Fig. 2. Ameba com mitoze, estádio das placas equatoriais. Fig. 13 o mesmo em aumento maior.
Fig. 3. O mesmo, estádio das placas filhas, na Fig. 16 em maior aumento.
Fig. 4. O mesmo, telofaze ; na Fig. 4 *a* com mais aumento.
Fig. 5. Principio da divizão celular e reconstrução dos nucleos filhos ; estes ultimos em maior aumento nas Fig. 5 *a* e 5 *b*.
Fig. 6. Fim da divizão celular e reconstrução dos nucleos filhos ; estes ultimos em maior aumento nas Fig. 6 *a* e 6 *b*.
Fig. 7. Nucleo em repouzo com centriolo no cariozoma.
Fig. 8-11. Profazes da mitoze com divizão do centriolo e formação dos cromozomios do cariozoma.
Fig. 12-15. Metafazes da divizão nuclear.
Fig. 16. Anafaze da divizão nuclear
Fig. 17. Dois nucleos filhos numa ameba ainda não dividida ; cariozomas ainda ligados por centrodesmoze (Mitoze abreviada).

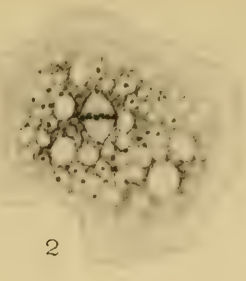
ERKLAERUNG DER TAFEL 10.

Sämmtliche Figuren beziehen sich auf *Amoeba hyalina* DANG. und sind mit dem ABBÉ'schen Zeichenapparat auf dem Arbeitstisch entworfen. Vergrösserung : Fig. 1—6 1600fach (Zeiss Apochr. Obj. 2mm und Comp. Oc. 8), Fig. 7—17 3700fach (Zeiss Apochr. Obj. 2mm, Comp. Oc. 18).

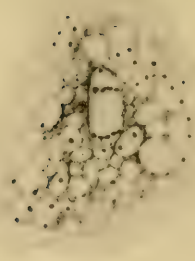
Fig. 1. Vegetative Form ; Abschnürung von Chromatinkörnern am Caryosom.
Fig. 2. Am. mit Mitose, Stadium der Aequatorialplatte. In Fig. 13 stärker vergrössert.
Fig. 3. Dasselbe, Tochterplattenstadium. In Fig. 16 stärker vergrössert.
Fig. 4. Dasselbe, Telophase ; in Fig. 4 *a* stärker vergrösssert.
Fig. 5. Beginn der Zellteilung und Rekonstruktion der Tochterkerne ; letztere in Fig. 5 *a* und 5 *b* stärker vergrössert.
Fig. 6. Ende der Zellteilung und Rekonstruktion der Tochterkerne ; letztere in Fig. 6 *a* und 6 *b* stärker vergrössert.
Fig. 7. Ruhender Kern mit Centriol im Caryosom.
Fig. 8-11. Prophasen der Mitose mit Teilung des Centriols und Ausbildung der Chromosomen aus dem Caryosom.
Fig. 12-15. Metaphasen der Kernteilung.
Fig. 16. Anaphase der Kernteilung.
Fig. 17. Zwei Tochterkerne in einer noch ungeteilten Amoebe ; Caryosome noch durch Centrodesmose verbunden (Abgekürzte Mitose).



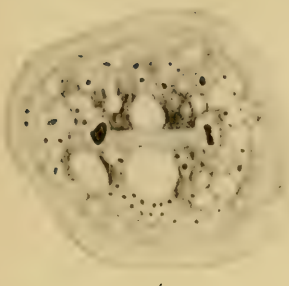
1



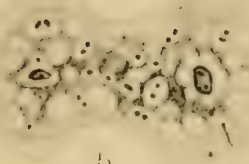
2



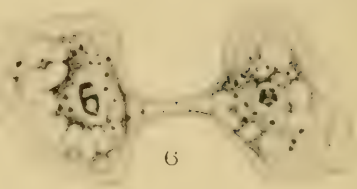
3



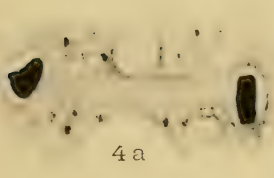
4



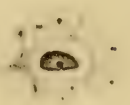
5



6



4a



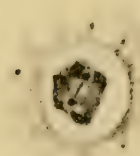
5a

5b

6a

6b

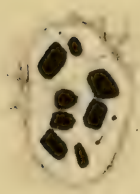
7



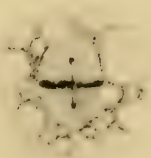
8

9

10



11



12

13

14

15

16

17

BIBLIOGRAFIA.

ARAGÃO, H. DE B. ..... 1909 Amoeba diplomitotica.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.
Tomo I, paj. 33.

DANGEARD, P. A. ..... 1900 Étude de la karyokynèse chez l'amoeba hyalina sp. nov.
Le Botaniste, 7.me série pag. 49.

DOBELL, C. ..... 1909 Researches on the intestinal protozoa of frogs and toads.
Quart. Journ. of Micr. Science, Vol. 53.

DOFLEIN, F. ..... 1907 Amoeben-Studien.
Arch. f. Protistenk. Suppl. Bd. 1.

HARTMANN, M. ..... 1908 Eine neue Dysenterieamoebe — Entamoeba tetragena.
Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene. Beiheft 5.

HARTMANN, M. ..... 1910 Nova ameba intestinal, Entamoeba testudinis n. sp.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.
Tomo II, Facic. 1, p. 3.

HARTMANN, M. &
CHAGAS, C. ..... 1910 Flagellatenstudien.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.
Tomo II, Facic. 1, paj. 64.

HARTMANN, M. &
PROWAZEK, S. V..... 1907 Blepharoplast, Caryosom und Centrosom.
Archiv f. Protistenk, Bd. 10.

JANICKI, C. V. ..... 1909 Ueber Kern und Kernteilung bei Entamoeba blattae BUETSCHLI.
Biol. Centralbl. Bd. 29, p. 381—393.

NAEGLER, K. ..... 1909 Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amoeben.
Archiv f. Protistenk. Bd. 15.

VAHLKAMPF, E. Beiträge zur Biologie und Entwicklungsgeschichte von Amoeba limax einschliesslich der Züchtung auf künstlichem Nährboden.
Archiv f. Protistenk. Bd. 5, p. 167—221.

WASIELEWSKI V. &
HIRSCHFELD ..... 1909 Zur Technik der Amoebenuntersuchung.
Hygienische Rundschau — Jahrgang XIX.

WENYON, C. M. ..... 1907 Observations on the Protozoa in the Intestine of Mice.
Archiv f. Protistenk. Suppl. I.

Estudos de citolojia em nova especie de coccidio, "Adelea hartmanni", do intestino do Dysdercus ruficollis L.

PELO

Dr. Carlos Chagas,

Chefe de serviço.

(Com as estampas 11 - 15)

Cytologische Studien ueber "Adelea hartmanni", ein neues Coccidium aus dem Darme von Dysdercus ruficollis L.

VON

Dr. Carlos Chagas,

Abteilungsvorsteher am Institute.

(Mit Tafeln 11 - 15)

MATERIAL E TECNICA.

O material que nos serviu para estes estudos provem de intensas infeções encontradas em dois unicos exemplares d'um hemiptero da subfamilia « *Pyrrhocoridæ* » *Dysdercus ruficollis* L., (*) cujo intestino mostrava elevadissimo numero de parazitos, em todos os estádios evolutivos.

Pesquizas posteriores, em numerozos exemplares daquelle hemiptero não nos forneceram nova infeção, pelo que tivemos de realizar nossos estudos nos unicos preparados iniciais, nelles encontrando, aliaz, todos os estádios dos ciclos evolutivos, esquizogonico e esporogonico, do parazito.

Com os intestinos dos dois hemipteros fizemos esfregaços, dissociando os tecidos das paredes intestinais e espalhando com cuidado, sem esmagar o material, as fézes

(*) Devemos a determinação dessa especie á gentileza do Snr. R. von Ihering do Muzeu Paulista ao qual deixamos consignado aqui nosso agradecimento.

MATERIAL UND TECHNIK.

Das Material, welches diesen Studien zu Grunde liegt, stammt von zwei intensiv infizierten Exemplaren einer Wanzenart (*Dysdercus ruficollis* L. zu Fam. *Pyrrhocoriden*), (*) deren Darm eine sehr grosse Zahl dieser Parasiten in allen Entwicklungsstadien aufwies. Spätere Untersuchungen an zahlreichen Exemplaren derselben Hemipterenart, ergab kein weiteres Material dieser Infektion, so dass ich meine Studien auf die ursprünglichen Präparate beschränken musste, in welchen sich übrigens alle Stadien, sowohl der schizogonischen, als auch der sexuellen und sporogonischen Entwicklung vorfanden.

Mit dem Darmkanal der beiden Wanzen machte ich Ausstrichspräparate, indem ich das Gewebe zerzupfte und die Fäzes sorgfältig, ohne Zerquetschung des Mate-

(*) Herrn R. von Ihering vom Muzeu Paulista, der die Art für mich bestimmte, möchte ich dafür an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen.

prezentes. Estes esfregaços foram fixados no sublimado-alcool de SCHAUDINN e córados pela hematoxilina férrea, segundo o metodo de HEIDENHAIN. Os aspetos extracelulares observados demonstram o sucesso da tecnica uzada que, no cazo, apezar de simples, foi suficiente para garantir a verdade das deduções. A deficiencia de material não nos permitiu, infelizmente, a pratica de córtes, nos quais poderiamos ter noção, talvez mais clara, dos estádios intracelulares do parazito e esclarecer um fenomeno, adiante referido, de ordem fiziolojica, sobre cuja interpretação permanecemos indecizo.

INTRODUÇÃO.

Nos estudos de SIEDLECKI (1899) sobre o ciclo evolutivo da *Adelea ovata*, parazito do intestino do *Lithobius forficatus*, vêm referidos pela primeira vez, os fenomenos citolojicos intimos correlativos aos diversos estádios da evolução de um coccidio do genero *Adelea*. Aí, no ciclo esquizogonico, aquelle experimentador demonstrou a existencia de dimorfismo, bem caraterizado pela diversidade de aspetos estruturais no macro- e no microesquizonte. Estudando o processo citolojico na macroesquizogonia, SIEDLECKI verificou a transformação do cariozoma inicial (por gemulação) em duas esferas cromaticas, colocadas na zona de suco nuclear. As duas esferas primitivas, por processo identico, davam esferas cromaticas secundarias que, a principio colocadas na face interna da membrana nuclear, pela rutura desta vinham colocar-se na superficie do plasma do parazito, aí constituindo novos cariozomas, centros de atração da cromatina contida na zona de suco nuclear.

As novas estruturas nucleares, assim constituidas, transformavam o parazito em organismo multinucleado, tendo os nucleos, a principio, o aspeto estelar carateristico, condensando-se depois, em cada um delles, a substancia cromatica, ficando assim organizados os nucleos dos novos merozoitos.

rials, ausbreitete. Die Fixation geschah mit Sublimatalkohol nach SCHAUDINN und die Färbung mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN. Die beobachteten Strukturbilder bewiesen den guten Erfolg dieser Technik, die in diesem Falle bei aller Einfachheit vollkommen genügte, um die Richtigkeit der Schlüsse zu garantieren. Der Mangel an Material gestattete mir leider nicht, Schnitte zu machen, welche uns vielleicht eine genauere Kenntnis der intracellulären Parasitenstadien und Aufklärung über eine noch zu erwähnende physiologische Erscheinung verschafft hätten, über deren Deutung ich im Ungewissen blieb.

EINLEITUNG.

Die genaueren cytologischen Erscheinungen bei den verschiedenen Entwicklungsstadien eines Coccidiums aus dem Genus *Adelea* finden sich zum ersten Male in SIEDLECKI's Studien über den Entwicklungscyclus von *Adelea ovata* aus dem Darme von *Lithobius forficatus* beschrieben (1899). Dieser Forscher zeigte beim schizogonischen Entwicklungscyclus dieser Art das Vorkommen eines Dimorphismus, welcher durch die verschiedenen Strukturbilder der Makro- und Mikroschizonten deutlich charakterisiert ist. Während des Studiums der cytologischen Vorgänge bei der Makroschizogonie beobachtete SIEDLECKI eine Umwandlung des ursprünglichen Caryosomas durch Knospung in zwei chromatische Sphären, welche in der Kernsaftzone lagen. Diese gaben durch einen analogen Prozess secundäre chromatische Sphären, welche zuerst an der Innenseite der Kernmembran lagen, aber nach Zerreissung derselben an die Oberfläche des Parasitenplasmas rückten und dort neue Caryosomen bildeten, indem sie für das in der Kernsaftzone gelegene Chromatin Attraktionszonen bildeten.

Die so gebildeten neuen Kernstrukturen verwandelten den Parasiten in einen vielkernigen Organismus, dessen Kerne anfangs typische sternförmige Gestalt

Estudando a formação dos microgâmetas, nos microgametócitos, Siedlecki referiu, no fenomeno, duas divizões nucleares, que devem ser interpretadas como divizões de redução. D'aí rezultavam quatro microgâmetas individualizados.

Os processos citolojicos estudados na *Adelea ovata* por Siedlecki, assim como o ciclo evolutivo deste coccidio, foram, em seu conjunto, verificados por Léger na *Adelea dimidiata* e na *Adelea tipulidae*.

Dobell, estudando alguns estádios do ciclo evolutivo do mesmo coccidio, cuidou principalmente de explicar o processo de formação dos microgâmetas como diferenciação do nucleo, provindo de cromidios. Segundo Dobell o cariozoma do nucleo de um microgametócito, para a formação de microgâmetas, aprezentava-se sob a forma de rede cromatica. Depois da associação do microgametócito com o macrogametócito, os elementos da rede cromatica intranuclear eram expulsos para o citoplasma, onde formavam estrutura cromidial completa (*chromidial net.*) Esta estrutura dividia-se então em quatro massas, a principio com aspeto estelar, que se condensavam depois em corpusculos cromaticos esfericos, destes rezultando os quatro microgâmetas, organismos com uma das extremidades afilada e aprezentando na parte central um vacuolo. Dobell interpreta ainda como condição cromidial o aspeto da cromatina no citoplasma do macromerozoito.

Revendo, em recentes estudos, a citolojia da *Adelea ovata*, Jollos (1909) traz ao assunto noções interessantes, interpretando os fenomenos observados á luz das novas idéas de Schaudinn, Hartmann e v. Prowazek sobre a organização e a evolução do nucleo nos protozoarios.

Segundo Jollos a macro- e a microesquizogonia da *Adelea ovata* são realizadas segundo dois processos: No primeiro delles, o nucleo do esquizonte sofre divizões binarias sucessivas, homopolares, dellas rezultando os nucleos das unidades

zeigten; später verdichtete sich in denselben die chromatische Substanz und organisierte sich zu den Kernen der neuen Merozoiten.

Beim Studium der Bildung der Mikrogameten in den Mikrogametocyten, beschreibt Siedlecki das Auftreten zweier Kernteilungen, die als Reduktionsteilungen aufzufassen sind. Daraus resultieren vier getrennte Mikrogameten.

Die von Siedlecki bei *Adelea ovata* studierten cytologischen Prozesse und der Entwicklungscyclus derselben wurde von Léger bei *Adelea ovata* und bei *A. tipulidae* bestätigt.

Dobell, welcher einige Stadien des Entwicklungscyclus desselben Coccidiums studierte, suchte besonders den Prozess der Mikrogametenbildung als eine Differenzierung der Kerne aus einem Chromidium hinzustellen. Nach ihm zeigt sich das Caryosom des Mikrogametocytenkernes bei der Bildung der Mikrogameten in der Form eines chromatischen Netzes. Nach der Vereinigung von Mikro- und Makrogametocyten wurden die Elemente des intranucleären Chromatinnetzes in das Cytoplasma entleert, woselbst sie ein Chromidialnetz bildeten. Diese Struktur teilte sich dann in vier Massen, die zuerst Sternform zeigten und sich dann in runde Chromatinkörperchen kondensierten, aus welchen die vier Mikrogameten hervorgingen. Diese Formen sind an einem Ende zugespitzt und zeigen im mittleren Teile eine Vakuole. Dobell deutet auch die Form des Chromatins im Cytoplasma der Makromerozoiten als einen Chromidialzustand.

Jollos (1909), der in neueren Studien die Cytologie der *Adelea ovata* nachuntersuchte, bringt in das Thema interessante Gesichtspunkte, indem er die beobachteten Erscheinungen im Lichte der neuen Ideen betrachtet, welche Schaudinn, Hartmann und v. Prowazek über die Evolution des Protozoenkernes äusserten.

Nach Jollos vollzieht sich die Makro- und Mikroschizogonie bei *Adelea ovata* auf zweierlei Art: bei der ersten erleidet der Schizontenkern successive homopolare

esquizogonicas. No segundo processo, o cariozoma experimenta divizões repetidas no interior do nucleo, espalhando-se as unidades cariozomicas pela zona de suco nuclear, constituindo cada uma dellas nova *enerjia*, no sentido de HARTMANN; dest'arte fica demonstrada a polienerjia do nucleo do coccidio

Rompendo-se a membrana nuclear passam os cariozomas para o plasma, onde continuam a se dividir e, por afofamento, se transformam em nucleos tipicos de merozoitos. E' a verificação, neste protozoario, da nova teoria de nucleos com polienerjia (*polyenergide Kerne*) formulada por MAX HARTMANN em trabalhos sobre processos citolojicos nos *radiolarios*.

Nos estudos de JOLLOS vem minuciozamente descrito o processo de divizão do cariozoma, havendo, ora mitoze primitiva (*promitoze*) do tipo da descrita por NAEGLER nas amebas do grupo *limax*, ora mitoze mais aperfeiçoada, com a formação de fuzo e com a prezença de placa equatorial (Est. 11, Fig. 5). Na mitoze primitiva, dá-se, primeiro, a divizão do centriolo, cujas metades se afastam, permanecendo ligadas pelo filamento central. Na parte central do cariozoma ha então rarefação da cromatina, formando-se especie de vacuolo que divide o cariozoma em duas metades iguais. Estas, a principio, semilunares, tornam-se depois esfericas, afastando-se uma da outra, sempre ligadas pelo filamento central (JOLLOS — Textfigur A.).

A redução nuclear do macrogametócito, segundo JOLLOS, verifica-se por processo de divizão inteiramente diverso do que se observa na esquizogonia, diferindo o fenomeno do processo de maturação referido por SIEDLECKI que verificou apenas a eliminação de cromatina para o plasma — a denominada « *épuration nucléaire* ». — Aqui o cariozoma do macrogametócito se alonga, aprezentando a fórma de biscoito, adelgaça-se na parte central, estrangula-se, sendo então eliminada metade delle, acompanhada de camada de

Zweiteilungen, aus welchen die Teilindividuen hervorgehen. Bei der zweiten Art erfährt das Caryosom im Innern des Kernes successive Zweiteilungen und die neugebildeten Einheiten zerstreuen sich über die Kernsaftzone, indem jede derselben eine neue Energide im Sinne HARTMANN's bildet; auf diese Weise wird die Polyenergie des Coccidienkernes erwiesen.

Nach Zerreissen der Kernmembran treten die Caryosome ins Plasma aus, wo sie sich weiter zu teilen vermögen und durch Auflockerung zu typischen Merozoitenkernen werden. Die Theorie der polyenergiden Kerne, welche HARTMANN bei seinen Arbeiten über die Cytologie der Radiolarien aufgestellt hat, wird auf diese Weise bei einem Coccidium begründet.

In den Studien von JOLLOS wird der Prozess der Caryosomteilung ausführlich beschrieben; es findet dabei entweder eine Promitose statt, wie sie von NAEGLER bei den Amoeben der *Limax*gruppe beschrieben wurde oder eine vollkommenere Mitose mit Spindelbildung und Aequatorialplatte (Taf. 11, Fig. 5). Bei der Promitose findet zuerst eine Teilung des Centriols statt, dessen Hälften auseinanderrücken, aber durch einen Centralfaden verbunden bleiben. In der Mitte des Caryosoms greift dann eine Rarefaction des Chromatins Platz, indem sich eine Art von Vacuole bildet, welche das Caryosom in zwei gleiche Teile zerlegt. Diese sind anfangs halbmondförmig, werden dann rund und entfernen sich endlich von einander, bleiben aber durch den Centralfaden verbunden, (JOLLOS, Textfigur A.).

Nach JOLLOS erfolgt die Kernreduktion des Mikrogametocyten durch einen, von dem, bei der Schizogonie gefundenen, sehr verschiedenen Teilungsvorgang, während SIEDLEICKI nur eine Ausstossung von Chromatin ins Plasma, eine sog. *épuration nucléaire*, beobachtet hatte. Es verlängert sich das Caryosom des Makrogametocyten und zeigt eine Biscuitform; die mittlere Partie verdünnt sich und schnürt sich ab, worauf die eine Hälfte zugleich mit einer Plasmaschicht ausgestossen wird.

plasma. Este processo é muito semelhante ao da formação dos corpos polares na maturação dos ovos dos metazoarios.

Os fatos citolojicos referidos por Jollos foram, em sua maioria, confirmados em nossas observações, havendo, apenas, diverjencias de pequena monta, na interpretação de algumas minucias, entre as observações daquelle pesquizador e as que passamos a relatar.

MACROESQUIZOGONIA DA « ADELEA HARTMANNI ».

Os macromerozoitos da *Adelea hartmanni* (Est. 11, Fig. 1) aprezentam-se como organismos falciformes, tendo uma das extremidades arredondada, e a outra afilada, munidos de volumozo nucleo com membrana, de contornos nitidos, e grande cariozoma, em cujo centro, ás vezes, é vizivel um centriolo. Na zona de suco nuclear vêm-se trabeculas de linina e na face interna da membrana do nucleo alguns granulos de cromatina. O plasma, granulozo, mostra grandes alveolos de dimensões maiores do que nos micromerozoitos. Penetrando nas celulas epiteliais do intestino o macromerozoito se transforma em macroesquizonte, cuja estrutura aprezenta aspetos varios que passamos a estudar:

O nucleo do macroesquizonte mostra dois aspetos distintos, correspondentes ás duas modalidades de divizão multipla referidas na *Adelea ovata*.

Num dos cazos o nucleo aprezenta em seu interior diversos cariozomas, ora colocados na periferia, ás vezes fazendo saliencia no plasma (Est 11, Fig. 2), ora colocados no interior de massa de substancia acromatica, na zona central do nucleo (Est. 11, Fig. 8 e 9). Destruida a membrana nuclear passam os cariozomas para o plasma, onde sofrem ainda divizões sucessivas, (Est. 11, 12, Fig. 7, 9 a, 10, 11, 12).

No outro cazo a divizão do nucleo é realizada por mitoze homopolar (Est. 11,

Der Vorgang gleicht somit ganz einer Richtungskörperbildung bei der Reifung der Metazoeneier.

Die von Jollos berichteten Tatsachen wurden zum grössten Teile in meinen Beobachtungen bestätigt und nur in einigen Einzelheiten gab es kleine Abweichungen zwischen den Beobachtungen jenes Forschers und den noch zu beschreibenden von mir selbst.

MAKROSCHIZOGONIE DER « ADELEA HARTMANNI ».

Die Makromerozoiten der *Adelea Hartmanni* (Taf. 11, Fig 1) erscheinen als sichelförmige Organismen mit einem abgerundeten und einem zugespitzten Ende; sie zeigen einen grossen Kern mit wohlumschriebener Membran und grossem Caryosom, in dessen Mitte man öfters ein Centriol wahrnimmt. In der Kernsaftzone sicht man Lininfäden und an der Innenseite der Membran einige Chromatinkörnchen. Das granulierte Plasma zeigt grosse Alveolen, welche in ihren Dimensionen diejenigen der Mikromerozoiten übertreffen.

Nach seinem Endringen in die Epithelialzellen des Darmes verwandelt sich der Makromerozoit in einen Makroschizonten, dessen verschiedene Strukturbilder ich weiter unten erörtere. Der Kern des Makroschizonten zeigt zwei verschiedene Formen, entsprechend den zwei Arten der multiplen Teilung, über die Jollos bei der *Adelea ovata* berichtet hat.

Im ersten Falle zeigt der Kern in seinem Innern verschiedene Caryosomen, bald peripherisch gelagert und manchmal ins Plasma vorspringend (Fig. 2), bald im Centrum des Kernes im Innern einer Masse achromatischer Substanz (Taf. 11, Fig. 8 und 9). Nach Zerstörung der Kernmembran treten die Caryosome ins Plasma über, wo sie noch weitere successiven Teilungen eingehen. (Taf. 11-12, Fig. 7, 9a, 10, 11, 12).

Im andern Falle erfolgt die Kernteilung durch eine homopolare Mitose

Fig. 3, 5). Nesta, é muitas vezes possivel observar a promitoze do cariozoma na *Adelea ovata*, segundo JOLLOS (Est. 11, Fig. 3). Tanto nos cariozomas, ainda no interior de nucleos, quanto naquelles livres no plasma do macroesquizonte, além da divizão pela mitoze primitiva, segundo o processo descrito por NAEGLER nas amebas, verifica-se mitoze mais aperfeiçoada, com divizão previa do centriolo, formação de placa equatorial e a existencia, no centro do fuzo, de filamento central (Est. 11, Fig. 4-5-8 a). A divizão prévia dos centriolos vem demonstrada na fig. 7, onde são vistos no plasma dois cariozomas volumozos, tendo, lateralmente colocados e ligados por delgada fibrila, dois pequenos corpusculos de cromatina, que reprezentam as metades da divizão dos centriolos. Aspeto identico é verificado num cariozoma intranuclear da fig 6. Merece especial atenção o aspeto da mitoze do cariozoma na fig. 8 a, porquanto aí, pela diferenciação bem feita, são muito nitidos os dois centriolos no interior dos novos cariozomas, ligados por filamento central. Transversalmente colocados sobre o filamento central existem, nesta figura duas massas de cromatina que reprezentam, talvez, a cromatina da zona de suco nuclear, cuja divizão seria realizada posteriormente á do cariozoma e sempre dirijida pelo filamento central rezultante da divizão do centriolo. O mesmo aspeto mostram as fig.5 e 12, reprezentando a primeira a divizão inicial do nucleo de um macroesquizonte, e a segunda as divizões secundarias dos nucleos num esquizonte multinucleado.

Nos estádios que precedem imediatamente a divizão do plasma (Fig. 13), os nucleos do macroesquizonte mostram aspeto irregular da cromatina, que aí se encontra sob a fórma de corpusculos, dispostos irregularmente sobre trabeculas de substancia acromatica e ligados por filamentos de cromatina e os contornos dos nucleos não têm

(Fig. 3, 5). Bei dieser kann man oft Bilder beobachten, welche der Promitose bei *Adelea ovata* nach JOLLOS gleichen (Fig. 3). Sowohl bei den noch im Kerninnern, als auch bei frei im Plasma des Makroschizonten liegenden Caryosomen, kann man, ausser der Teilung durch primitive Mitose, wie sie NAEGLER bei Amoeben beschrieben hat, eine andere, vollkommenere beobachten, bei welcher das Centriol geteilt, eine Aequatorialplatte gebildet wird und in der Mitte der Spindel ein Centralfaden besteht (Fig. 4, 5, 8a). Die vorhergehende Teilung der Centriolen ist aus der Fig. 7 ersichtlich, auf der man im Plasma zwei grosse Caryosomen sieht, neben welchen seitlich zwei durch eine dünne Fibrille verbundene Chromatinkörperchen liegen, welche die Teilungshälften des Chromatins vorstellen. Ein ähnliches Bild erkennt man bei einem intranucleären Caryosom auf Fig. 6. Besondere Aufmerksamkeit verdient das Bild der Caryosommitose in Fig. 8a, da hier die gut gelungene Differenzierung die beiden, durch einen Centralfaden verbundenen, Centriolen im Innern der neuen Caryosomen deutlich erkennen lässt. In dieser Figur sieht man, auf dem Centralfaden quer gelagert, zwei Chromatinmassen, welche vielleicht das Chromatin der Kernsaftzone darstellen, dessen Teilung erst nach derjenigen der Caryosome stattfindet, immer durch die Centralfaser beeinflusst, welche aus der Teilung der Centriolen hervorgeht. Dasselbe Bild zeigen Fig. 5 und 12, von denen erstere die anfängliche Kernteilung eines Makroschizonten und letztere die Secundärteilungen der Nuclei eines vielkernigen Schizonten zeigt.

In den Stadien, welche der Plasmateilung anmittelbar vorausgehen (Fig. 13) zeigen die Kerne der Makroschizonten eine unregelmässige Chromatinfigur, welche hier in der Form unregelmässig auf Fäden achromatischer Substanz gereihter und unter sich durch Chromatinfäden verbundener Körnchen erscheint. In diesem Stadium sind die Umrisse des Kernes nicht

neste estádio, nitidez, e aí não existe ainda membrana nuclear apreciavel. Trata-se, portanto, de nucleo em organização. A divizão do plasma inicia-se na periferia, condensando-se massas plasmaticas em torno dos nucleos e formando-se fendas nos intervalos. O numero de merozoitos de um macroesquizonte é bastante variavel, quazi sempre muito grande, sendo dificil contar as unidades prezentes, em vista da superpozição dellas em diversos planos.

Os merozoitos acham-se colocados paralelamente, os nucleos situados de modo irregular, não havendo, no centro, massa de plasma rezidual. Nas fórmas, cuja esquizogonia está já completa, os nucleos mostram um unico cariozoma compacto, cercado por uma orla clara, na qual é vista substancia cromatica (fig. 15). Não raro é vizivel, na superficie da fórma segmentada, delgada pelicula, que reprezenta, de certo, os limites da celula em cujo interior se realizou a evolução do parazito, senão o periplasto deste.

MICROESQUIZOGONIA.

Os fenomenos citolojicos na divizão multipla do microesquizonte são, em seu conjunto, identicos aos referidos na macroesquizogonia, havendo talvez aqui, em alguns dos aspetos observados, maior nitidez e baze mais satisfatoria para a interpretação que julgamos aplicavel aos fatos estudados.

O micromerozoito é organismo ovoide (fig. 16), cujo plasma, não granulozo, se aprezenta alveolar, sendo os alveolos sensivelmente menores do que os do macromerozoito. O nucleo mostra um cariozoma esferico, em cujo centro é quazi sempre vizivel um centriolo (muito nitido na fig. 16). Circunda o cariozoma zona clara, com finas trabeculas de linina, transversalmente

scharf umschrieben und es existiert noch keine eigentliche Kernmembran. Es handelt sich also um einen noch in Bildung begriffenen Kern.

Die Teilung des Plasmas beginnt an der Peripherie, indem sich die Plasmamassen in der Umgebung der Nuclei verdichten und dazwischen Spalten auftreten. Die bei einem Makroschizonten gebildete Merozoitenzahl ist ziemlich schwankend, aber gewöhnlich sehr gross, so dass es in Folge der gegenseitigen Ueberlagerung schwer fällt, die Einzelindividuen zu zählen.

Die Merozoiten findet man parallel gelagert, mit unregelmässig angeordneten Kernen, während im Centrum keine Masse von Residualplasma übrig bleibt. Bei vollendeter Schizogonie zeigen die Kerne ein kompaktes Caryosom, umgeben von einer hellen Zone, welche Chromatin aufweist (Fig. 15). Nicht selten sieht man an der Aussenfläche der segmentierten Formen eine zarte Haut, welche entweder die Gränze der Zelle, in deren Innern der Parasit sich entwickelte, darstellt oder auch den Periplast des Letzteren.

MIKROSCHIZOGONIE.

Die cytologischen Erscheinungen bei der multiplen Teilung der Mikroschizonten sind im Ganzen den, bei der Makroschizogonie beschriebenen, ähnlich ; doch bemerkt man bei einigen der beobachteten Bilder wohl eine grössere Deutlichkeit und sie bilden für die Erklärung der studierten Verhältnisse eine bessere Grundlage.

Der Mikromerozoit (Fig. 16) ist ein eiförmiger Organismus, dessen Plasma nicht granuliert, aber wabig erscheint ; die Waben sind aber jedoch bedeutend kleiner, als bei den Makromerozoiten. Der Kern zeigt ein kugeliges Caryosom,in dessen Centrum fast immer ein Centriol sichtbar ist. (Sehr deutlich in Fig. 16). Um das Caryosom liegt eine klare Zone mit feinen, transversal gelagerten Lininbälkchen, welche durch keine deutliche Membran abgegrenzt

colocadas, não limitadas por membrana apreciavel. Ligado por um filamento ao cariozoma, mais especialmente ao centriolo, existe um corpusculo de cromatina, ora situado no plasma, ora no interior da zona clara que circunda o cariozoma. Na fig. 16, além do corpusculo referido, dois outros existem, numa das extremidades; estes deixam de ter importancia como estrutura normal. (Substancias de reserva).

Nos microesquizontes mais dezenvolvidos (fig. 17) o nucleo mostra diversos cariozomas, ora situados na periferia, ora colocados na zona de suco nuclear. A multiplicação dos cariozomas no interior do nucleo realiza-se pelo mesmo processo que na macroesquizogonia. Pela rutura do nucleo (fig. 18) os cariozomas passam para o plasma, onde continuam a se multiplicar, ficando o microesquizonte transformado em um organismo esferico com grande numero de cariozomas (fig. 21). Na microesquizogonia não observámos divizão mitozica do nucleo primitivo, tão clara na fig. 5 da macroesquizogonia. Acreditamos, por isso, que a divizão multipla é aqui realizada, quazi sempre, pela rutura de um policario.

Nas fórmas segmentadas os micromerozoitos se aprezentam irregularmente dispostos em varios planos. O numero de unidades em cada individuo esquizogonico é variavel, de vinte ou mais merozoitos, cada um destes aprezentando no nucleo, quazi sempre, dois corpusculos cromaticos. Estes, as mais das vezes, são de igual volume, ligados por um filamento; em alguns merozoitos, porém, um dos corpusculos é reprezentado por minuscula granulação (fig. 26). Este aspeto da cromatina nuclear dos micromerozoitos ou está em relação com o mecanismo de mitoze dos nucleos no microesquizonte, ou, o que é talvez mais provavel, indica uma multiplicação precoce do cariozoma nestes organismos, destinada á formação de policarios.

wird. Bald im Plasma, bald im Innern der hellen Zone, welche das Caryosom umgibt, findet sich ein Chromatinkörperchen, welches mit dem Caryosom und ganz besonders mit dem Centriol durch einen Faden verbunden ist. In Fig. 16 sieht man ausser diesem Chromatinkörperchen noch zwei andere an einem der Enden. Da diese nicht konstant sind, können sie nicht die Bedeutung normaler Strukturen beanspruchen. (Reservestoffkörner).

In weiter entwickelten Mikroschizonten (Fig. 17) zeigt der Kern verschiedene Caryosome, bald an der Peripherie, bald in der Kernsaftzone gelagert. Die Vermehrung der Caryosome im Kerninnern vollzieht sich durch denselben Vorgang, wie bei der Makroschizogonie. Durch Zerreissen des Kernes (Fig. 18) treten die Caryosome ins Plasma über, wo sie sich weiter vermehren, so dass sich der Mikroschizont in ein rundes Gebilde mit vielen Caryosomen umwandelt (Fig. 21). Bei der Mikroschizogonie habe ich keine mitotische Teilung des ursprünglichen Kernes beobachtet, wie sie bei der Makroschizogonie in Fig. 5 so deutlich erscheint. Ich glaube deshalb, dass die vielfache Teilung hier immer durch die Ruptur eines Kernes mit vielen Caryosomen stattfindet.

Nach stattgefundener Segmentierung zeigen sich die Mikromerozoiten in verschiedenen Ebenen unregelmässig angeordnet. Die Zahl der einzelnen, durch die Teilung entstandenen, Individuen schwankt und beträgt 20 oder mehr, von denen fast jedes in seinem Kerne zwei Chromatinkörperchen aufweist. Diese sind gewöhnlich von gleicher Grösse und in einigen Merozoiten durch einen Faden verbunden; dagegen ist in Fig. 26 eines der Körperchen durch ein kleines Korn vertreten. Dieses Bild des Kernchromatins der Mikromerozoiten steht entweder in Beziehung zum Mechanismus der Mitose der Mikroschizontenkerne oder, was wohl wahrscheinlicher ist, es zeigt eine frühzeitige Teilung des Caryosomas an, die bei diesem Organismus zur Bildung eines Polycarions bestimmt ist.

A multiplicação dos cariozomas nos microesquizontes é realizada por processo identico ao que verificámos na macroesquizogonia, havendo aqui aspetos bem tipicos de promitoze (fig. 20).

CICLO SEXUADO DA ADELEA HARTMANNI.

I. — Redução do macrogametócito (maturação).

Como maturação dos macrogametócitos nos coccidios, têm sido descritos diversos processos que, com certeza, em parte nada têm que ver com a verdadeira maturação (processos de redução) e que consistem, ás vezes, em divizão nuclear apenas modificada.

Pelas observações de SCHAUDINN a maturação do macrogametócito no *Coccidium schubergi* consta da expulsão total do cariozoma, que é visto na superficie do plasma dividido em varios corpusculos, exercendo estes, segundo aquelle observador, atração sobre os elementos machos fecundantes. Na *Cyclospora caryolytica* o fenomeno de redução inicia-se pela fragmentação do cariozoma em finos granulos que se espalham na zona de suco nuclear. Divide-se então o nucleo, por mitoze primitiva, e das duas unidades rezultantes uma sofre nova mitoze, ficando assim formados trez nucleos, dos quais dois são reabsorvidos no citoplasma como nucleos reduzidos, e o terceiro constitue o pronucleo do macrogâmeta.

Na *Adelea ovata*, segundo SIEDLECKI, só a cromatina, da zona de suco nuclear (nucleo exterior) seria eliminada, talvez com uma pequena porção de substancia separada da superficie do cariozoma. Para se completar o fenomeno o nucleo do coccidio se aproximaria da periferia, rompendo-se-lhe a membrana e assim sendo eliminada parte da substancia nuclear, vista muitas vezes aderente á superficie do macrogâmeta. Este fenomeno, como já o notára SIEDLECKI, não é processo de redução,

Die Vermehrung der Caryosome vollzieht sich bei den Mikroschizonten durch einen ähnlichen Prozess, wie wir ihn bei der Makroschizogonie konstatiert haben, indem man hier typische Bilder einer Promitose findet (Fig. 20).

SEXUELLER CYCLUS BEI ADELEA HARTMANNI.

I. — Kernreduktion oder Reifung der Makrogametocyten.

Als Reifung der Makrogametocyten sind bei Coccidien ganz verschiedene Vorgänge beschrieben worden, die teilweise sicher nichts mit echten Reife- oder Reduktionsprozessen zu tun haben, welche stets nur in einer, wenn auch modifizierten, Kernteilung bestehen. Nach SCHAUDINN's Beobachtungen zeigt sich bei *Coccidium schubergi* die Reifung der Makrogametocyten durch die vollständigen Ausstossung des Caryosomas, welches an der Oberfläche des Plasmas in verschiedene Körperchen geteilt erscheint, die auf die befruchtenden männlichen Elemente eine Anziehung ausüben. Bei *Cyclospora caryolytica* beginnt die Reduktion mit einem Zerfall des Caryosomas in feine Körner, welche sich in der Kernsaftzone verteilen. Hierauf teilt sich der Kern durch eine primitive Mitose und jede von den zwei neugebildeten Einheiten geht wiederum eine Mitose ein, so dass drei Kerne entstehen, von denen zwei im Cytoplasma als Reduktionskerne absorviert werden, während der dritte den Pronucleus des Makrogameten bildet.

Bei *Adelea ovata* würde nach SIEDLECKI nur das Chromatin der Kernsaftzone (der Aussenkern) ausgestossen, vielleicht zusammen mit einer kleinen Menge von der Oberfläche des Caryosoms abgelöster Substanz. Bei Vollendung des Vorganges soll sich der Coccidienkern der Peripherie nähern, worauf die Kernmembran einreisst und so ein Teil der Kernsubstanz ausgestossen wird, den man öfters noch der Oberfläche des Makrogameten anhängen sieht. Dieser Vorgang ist,

e corresponde, segundo JOLLOS, á diminuição preliminar do nucleo nas divizões de maturação dos ovos dos metazoarios.

Como vimos, JOLLOS, nesse coccidio, observou, ao contrario, verdadeira divizão de redução, havendo, segundo elle, estrangulamento do cariozoma e eliminação de parte delle, cercada de camada de plasma.

Na *Adelea hartmanni*, pela interpretação que nos parece cabivel aos aspetos das fig. 24 e 25, e de muitas outras identicas que observámos, a verdadeira divizão de redução do macrogametócito é igualmente realizada por mitoze de natureza especial, como passamos a referir:

Os macrogametócitos, antes da redução nuclear, aprezentam grande nucleo, munido de volumozo cariozoma, quazi sempre excentrico e circundado de orla clara; para fóra desta orla, na zona de suco nuclear, a substancia acromatica, ora se acha disposta em larga faxa semilunar, que abraça em sua concavidade o cariozoma (fig. 22), ora se aprezenta espalhada de modo difuzo (fig. 23). A membrana nuclear é bastante espessa e de contornos nitidos.

Como fenomeno inicial pensamos que parte da cromatina do cariozoma se difunde na zona de suco nuclear, sendo aí vista sob a fórma de corpusculos colocados nas trabeculas de linina, ficando o cariozoma reduzido a pequena esfera, muito menor do que nos macrogametócitos em estádios anteriores.

Para a redução nuclear (fig. 24) o cariozoma se divide e metade delle, que permanece ligada á outra pelo filamento central, se afasta do cariozoma primitivo.

Em torno do novo cariozoma (centriolo) se condensa parte da cromatina da zona de suco nuclear, organizando-se assim um nucleo de redução, que se aproxima da superficie e é eliminado (fig. 25). Ha aí,

wie schon SIEDLECKI bemerkt hat, kein Reduktionsprozess, und entspricht nach JOLLOS wohl nur der, den Reifeteilungen vorausgehenden, Kernverminderung der Metazoeneier.

Wie wir sahen, hat dagegen JOLLOS bei diesem *Coccidium* eine echte Reduktionsteilung beobachtet, indem nach ihm eine Durchschnürung des Caryosomas und Ausstossung des einen Teiles mit einer umgebenden Plasmaschicht stattfindet.

Nach der Deutung, die mir den Bildern der Fig. 24 und 25 und vielen ähnlichen von mir beobachteten zuzukommen scheint, findet bei *Adelea hartmanni* gleichfalls eine echte Reduktionsteilung der Makrogametocyten durch eine besondere Art von Mitose statt, wie sie bereits geschildert wurde. Vor der Kernreduktion zeigen die Makrogametocyten einen grossen Nucleus mit voluminösem Caryosom, welches fast immer excentrisch liegt und von einem hellen Saume umgeben ist; nach aussen von diesem und innerhalb der Kernsaftzone findet sich die achromatische Substanz in Form eines breiten Halbmondes, welcher das Caryosom in seiner Konkavität einschliesst (Fig. 22) oder sie erscheint diffus verteilt (Fig. 23). Die Kernmembran ist ziemlich dick und deutlich umschrieben.

Der erste Vorgang besteht nach meiner Ansicht darin, dass ein Teil des Chromatins aus dem Caryosoma in die Kernsaftzone übertritt, wo es in Form von Körnchen erscheint, welche auf den Lininbälckchen verteilt sind; das Caryosom wird dadurch auf eine Kugel reduziert, welche viel kleiner ist, als bei den früheren Stadien der Makrogametocyten.

Bei der Kernreduktion (fig. 24) teilt sich das Caryosom und eine Hälfte desselben, die mit der andern durch die Centralfaser verbunden bleibt, entfernt sich von dem Caryosom; sie erleidet während des Vorganges keine Veränderung und bleibt ungeteilt.

Um das neue Caryosom (Centriol) kondensiert sich ein Teil des Chromatins der Kernsaftzone, indem sich so ein Re-

como se vê, eliminação de uma parte da substancia do cariozoma, previamente difundida na zona de suco nuclear, isto antes de divizão do cariozoma diminuido (centriolo). Este processo de redução pode ser interpretado como divizão nuclear modificada e assim ser colocado a par das verdadeiras divizões de redução observadas na *Cyclospora caryolytica* (SCHAUDINN) e *Adelea ovata* (JOLLOS), apezar da grande diferença aparente nesta ultima.

E' esta, entretanto, a interpretação que nos parece aceitavel, para as fig. 24 e 25, as quais evidentemente reprezentam a maturação do macrogametócito, não se podendo confundir com os fenomenos de divizão multipla dos macroesquizontes, nem ainda com a divizão do macrogâmeta fecundado. Sobre esse assunto, porém, esperamos realizar novas observações, que melhor o esclareçam.

II. — Associação dos gametócitos.

Foram SCHAUDINN e SIEDLECKI (1897) que primeiro interpretaram, na *Adelea ovata*, a associação prévia de gametócitos como ato precursor da fecundação, dando-se, neste cazo, a formação dos microgâmetas no microgametócito aderente ao elemento femeo e havendo aí redução do numero destes — quatro nos coccidios do genero *Adelea*.

Segundo SIEDLECKI, de regra, um unico microgametócito se uniria ao elemento femeo, sendo raro observar-se associação com dois elementos machos. Na observação de DOBELL, porém, essa ultima ocurrencia seria frequente.

A associação, na *Adelea hartmanni*, de dois microgametócitos a um macrogametócito é comumente vista (fig. 26) e tivemos oportunidade de observar alguns cazos de associação nos quais era de quatro

duktionskern bildet, welcher sich der Oberfläche nähert und ausgestossen wird (Fig. 25). Wie man sieht, findet hier die Ausstossung eines Teiles der Caryosomsubstanz statt, welche zuerst in die Kernsaftzone übergetreten war, jedoch erst nach einer Teilung der verkleinerten Caryosom (Centriols). Dieser Reduktionsvorgang lässt sich mithin als eine modifizierte Kernteilung auffassen und somit den echten Reduktionsteilungen bei *Cyclospora caryolitica* (SCHAUDINN) u. *Adelea ovata* (JOLLOS) anreihen, trotz der scheinbar grossen Abweichung gegenüber der letzteren. Dies scheint mir immerhin für die Figuren 24 und 25 die einzig annehmbare Deutung, da sie offenbar die Reifung des Makrogametocyten zeigen und sich weder mit dem Vorgange der multiplen Teilung der Makroschizonten, noch mit der Teilung des befruchteten Makrogameten verwechseln lassen. Doch hoffe ich zur weiteren Aufklärung dieses Themas neue Beobachtungen anstellen zu können.

II. — Vereinigung der Gametocyten.

SCHAUDINN u. SIEDLECKI (1897) waren die ersten, welche bei *Adelea ovata* die Vereinigung der Gametocyten als einleitenden Akt für die Befruchtung auffassten, indem hier die Bildung der Mikrogameten in dem bereits am weiblichen Elemente haftenden Mikrogametocyten stattfindet, wobei ihre Zahl beim Genus *Adelea* stets vier beträgt. Nach SIEDLECKI soll sich in der Regel nur ein Mikrogametocyt dem weiblichen Elemente beigesellen und eine Vereinigung mit zwei männlichen Elementen selten sein; dagegen war in den Beobachtungen von DOBELL letzteres Vorkommnis häufig.

Bei *Adelea Hartmanni* ist die Vereinigung eines Makrogametocyten mit zwei Mikrogametocyten ganz gewöhnlich (Fig. 26) und ich sah auch einige Fälle solcher Vereinigungen, bei welchen die Zahl der Mikrogametocyten vier betrug (Fig. 28), ein meines Wissens in der Coccidienlitteratur noch unbeschriebener Fall.

o numero de microgametócitos (fig. 28), fato esse que não conhecemos referido na literatura dos coccidios.

Muito frequente, sinão constante, é a incluzão dos gametócitos associados no interior de espaço limitado por membrana de contornos nitidos e de bastante espessura, permanecendo essa membrana atravez todos os estádios da fecundação, até á divizão do macrogâmeta fecundado em esporoblastas. (fig. 26 a 30).

Sobre a intrepretação desse aspeto permanecemos indecizo entre duas hipotezes; ou reprezenta a membrana externa os limites da celula epitelial em que se tenha realizado a evolução dos gametócitos, e, nesse cazo, a fecundação deste coccidio, ao contrario do que acontece nas outras especies do genero *Adelea*, seria intracelular, ou, na segunda hipoteze que nos parece mais provavel, haveria aqui fenomeno semelhante ao que se verifica na associação das gregarinas, onde os gametócitos (gamontes) são incluidos no interior de verdadeira membrana cistica (Cisto de associação). Nunca observámos, nos aspetos numerozos de associação que se nos aprezentaram, restos de plasma celular, e, por outro lado, contra a primeira hipoteze fala ainda a coincidencia frequente da evolução, na mesma celula, de organismos dos dois sexos. Poderia, é certo, haver a penetração de microgametócitos nas celulas epiteliais em que se dezenvolveram elementos femeos, a modo do que acontece na « *Klossia helicina* », dando-se dentro da celula a fecundação. Só a pratica de córtes poderá esclarecer definitivamente esse ponto.

A incluzão dos dois gametócitos no interior de membrana cistica,isto é, a prezença aqui de cistos de associação, não importaria, aliaz, em anomalia de grande monta; expressaria mais condição biolojica comum aos coccidios e ás gregarinas no ciclo sexuado, condição que serviria, como o fazem outros fenomenos, para indicar as estreitas relações filojeneticas entre os dois grupos dos telosporidios.

Sehr häufig, wenn nicht konstant, ist der Einschluss der vereinigten Gametocyten im Innern eines beschränkten Raumes durch eine ziemlich dicke und deutlich umschriebene Membran, welche durch alle Befruchtungsstadien bis zum Zerfall der befruchteten Makrogameten in Sporoblasten bestehen bleibt (Fig. 26—30). Bei der Deutung dieser Erscheinung konnte ich zwischen zwei zulässigen Erklärungen nicht entscheiden; entweder repräsentiert die äussere Membran die Grenzen einer Epithelialzelle, in welcher die Entwicklung der Gametocyten stattfand (und in diesem Falle wäre die Befruchtung unseres Coccidiums, im Gegensatz zu den anderen Adeleaarten, eine intracelluläre), oder, was mir wahrscheinlicher erscheint, es fände hier etwas Aehnliches statt, wie bei den Gregarinen, wo die Gametocyten (Gamonten) im Innern einer wirklichen Cystenmembran eingeschlossen sind. Bei den zahlreichen Bildern einer Vereinigung, die ich zu sehen Gelegenheit hatte, konnte ich niemals Reste von Zellplasma erkennen und andererseits spricht auch gegen die erste Hypothese das allzuhäufige Zusammentreffen der gleichzeitigen Entwicklung von Organismen verschiedenen Geschlechtes im Innern einer und derselben Zelle. Es könnte allerdings ein Eindringen von Mikrogametocyten in Epithelialzellen, in welchen sich weibliche Elemente entwickelt haben, stattfinden, wie dies bei der *Klossia helicina* der Fall ist, worauf eine intracelluläre Befruchtung stattfände. Diese Frage kann nur durch die Schnittmethode definitiv aufgeklärt werden.

Der Einschluss der beiden Gametocyten innerhalb einer Cystenmembran, d. h. das Vorkommen von Associationscysten, würde übrigens keine sehr auffällige Anomalie darstellen; vielmehr wäre sie der Ausdruck eines weiteren, beiden Gruppen der Coccidien und Gregarinen gemeinsamen, Zustandes des sexuellen Cyclus, welcher, ebenso wie andere Erscheinungen, dazu dienen würde, die engen phylogenetischen Beziehungen zwischen den beiden Telosporidiengruppen zu erweisen.

III. — Fecundação.

Os microgametócitos, da *Adelea hartmanni*, quando aderentes aos macrogametócitos, se aprezentam como organismos de fórma e de dimensões variaveis, ora ovoides (fig. 28) ora mais ou menos alongados (fig. 33 e 35). O nucleo, ás vezes unico, como na fig. 35, mostra-se frequentemente com diversos cariozomas, quazi sempre em numero de quatro (policario). Não raro, como na fig. 33, o microgametócito aprezenta quatro nucleos distintos, possuindo cada um delles grande cariozoma destinado a formar o microgâmeta. Não nos foi possivel acompanhar o processo de formação dos microgâmetas; dada, porém, a condição de polienerjia do nucleo do microgametócito, é de acreditar que sejam os elementos fecundantes machos formados pela rutura daquelle policario.

Os microgâmetas são pequenos organismos, piriformes, com uma das extremidades afilada, constituidos quazi só de cromatina (fig. 26 e 34); são vistos, ora na superficie dos microgametócitos, ora colocados num ponto qualquer do espaço limitado pela membrana externa. Antes da penetração do microgâmeta o nucleo do macrogâmeta fórma o *fuzo de copulação*, cuja estrutura exata vem reprezentada nas fig. 26 e 37. Destas, a ultima reprezenta um macrogâmeta livre e fecundado, do qual já se destacou o microgametócito.

No fuzo de copulação a maior parte da cromatina do cariozoma permanece num dos pólos, distribuida em corpusculos distintos (cromozomios ?). A linina fórma duas faxas de fibrilas, que se dispõem lonjitudinalmente, constituindo dois arcos de concavidade para dentro e limitando externamente o fuzo. No centro deste ha sempre uma fibra ou fibrilas de substancia acromatica, que aprezentam em todo comprimento, irregularmente dispostos, corpusculos de cromatina; no meio do filamento central, ocupando quazi sempre exatamente o centro do fuzo, existe uma granulação, maior e esferica, de substancia

III. — Befruchtung.

Die Mikrogametocyten der *Adelea Hartmanni*, welche den Makrogametocyten anhaften, erscheinen als Organismen von wechselnder, bald eiförmiger (Fig. 28), bald mehr oder weniger länglicher Gestalt (Fig. 33 und 35). Der, manchmal, wie in Fig. 35, einheitliche, Kern zeigt oft mehrfache Caryosomen, fast immer in der Vierzahl (Polycaryon). Nicht selten zeigt der Mikrogametocyt vier Kerne (Fig. 33), von denen jeder ein grosses, für die Bildung der Mikrogameten bestimmtes Caryosom aufweist. Es war mir nicht möglich, diesen Bildungsprozess zu verfolgen; doch ist es, in Hinsicht auf die Polyenergie des Mikrogametocytenkernes, wahrscheinlich, dass die befruchtenden männlichen Elemente durch Ruptur dieses Polycaryons entstehen.

Die Mikrogameten sind kleine birnförmige, an einem Ende zugespitzte und fast nur aus Chromatin bestehende Elemente (Fig. 26 und 34); man findet sie bald an der Oberfläche des Mikrogametocyten, bald an einer beliebigen Stelle des, von der Aussenmembran begrenzten, Raumes. Vor dem Eindringen des Mikrogameten bildet der Makrogametenkern eine Kopulationsspindel, deren genauere Struktur in Fig. 26 und 37 dargestellt ist. Letztere zeigt einen freien und befruchteten Makrogameten, von dem sich der Mikrogametocyt bereits abgelöst hat.

Bei der Kopulationsspindel bleibt die Hauptmasse des Caryosomchromatines, in deutliche Körperchen (Chromosomen?) geteilt, an einem der Pole. Das Linin bildet zwei dicke Fibrillenbündel, welche sich längsweise anordnen und zwei nach innen konkave Bogen bilden, welche die Spindel nach aussen begrenzen. Im Centrum derselben findet sich immer eine Faser oder eine Anzahl von Fibrillen achromatischer Substanz, welche in ihrer ganzen Länge unregelmässig gelagerte Chromatinkörperchen zeigen; in der Mitte der Centralfaser und fast immer genau im Centrum der Spindel findet sich ein

cromatica (Fig. 37). O microgâmeta penetra pelo pólo afilado do fuzo (Fig. 26), havendo a fuzão da cromatina delle com a do macrogâmeta sobre o filamento central. Depois da penetração do microgâmeta, que transforma o macrogâmeta em *oocineto*, aparece na superficie deste membrana espessa, que vai constituir a membrana do cisto (fig. 26, 27 etc.).

IV. — Formação dos esporoblastos.

A primeira divizão do nucleo, no oocineto (fig. 27, vista um pouco de perfil) é realizada por mitoze, na qual a cromatina do cariozoma, pelo que pudemos concluir de alguns aspetos observados, se divide por estrangulamento em duas metades, que são levadas pelos centriolos para as extremidades do fuzo, aí constituindo placas polares; a cromatina da zona de suco nuclear se dispõe em cromozomios cujo numero e mecanismo de divizão não nos foi dado conhecer exatamente.

Dos dois nucleos rezultantes da primeira divizão só um sofre, na maioria das vezes, segunda mitoze (fig. 29), de modo que, no cisto, são formados trez esporoblastas. Isso constitue, sem duvida, anomalia biolojica, porquanto não conhecemos explicação para a dezharmonia de proceder dos dois nucleos filhos, rezultantes da primeira mitoze. Certo é, porém, que os cistos deste coccidio contêm apenas trez esporoblastas, conforme o demonstram amplamente as fig. 32 e 36, especialmente a ultima, nas quais os esporoblastas contidos no interior de um cisto ainda intato, se acham afastados uns dos outros, o que permitiria ver um quarto esporoblasta, se este existisse colocado em plano inferior.

Havia, nesse ponto, possibilidade de erro de interpretação, porquanto, tratando-se do estudo em esfregaços, um quarto esporoblasta poderia permanecer não vi-

grösseres und rundes Korn von chromatischer Substanz (Fig. 37).

Der Mikrogamet dringt fast immer an zugespitzten Ende der Spindel ein (Fig. 26), und es findet eine Fusion seines Chromatines mit demjenigen des Makrogameten auf der Centralspindel statt. Nach Eindringen des Mikrogameten, durch welches der Makrogamet zum Ookineten wird, erscheint an seiner Oberfläche eine dicke Membran, welche zur Cystenhaut wird (Fig. 26, 27 etc.).

IV. — Sporoblastenbildung.

Die erste Kernteilung im Ookineten (in Fig. 27 etwas von der Seite gesehen) findet durch eine Mitose statt, bei welcher das Chromatin des Caryosoms, soweit wir nach den vorliegenden Bildern urteilen konnten, in zwei Hälften durchgeschnürt wird, welche durch die Centriolen an die Enden der Spindel geführt werden, wo sie Polplatten bilden; das Chromatin der Kernsaftzone ordnet sich um den Centralfaden zu Chromosomen, über deren Zahl und Teilungsmechanismus ich nichts genaueres ausfindig machen konnte.

Von den beiden Kernen, die aus der ersten Teilung hervorgehen, geht in der Mehrzahl der Fälle nur einer eine zweite Teilung ein (Fig. 29), so dass in der Cyste drei Sporoblasten gebildet werden. Es repräsentiert dies zweifelsohne eine biologische Anomalie, da mir ein Grund für das ungleiche Verhalten der aus der ersten Mitose hervorgehenden Kerne nicht bekannt ist. Immerhin steht fest, dass die Cysten dieses Coccidiums nur drei Sporoblasten enthalten, wie zur Genüge aus den Fig. 32 und 36 hervorgeht, in welchen die, im Innern einer intakten Cyste enthaltenen, Sporoblaste von einander abstehen, so dass man einen vierten Sporoblasten leicht erkennen könnte, falls ein solcher sich in einer tieferen Ebene befände.

In diesem Punkte wäre eine fehlerhafte Auffassung möglich gewesen, da beim Studium von Ausstrichspräparaten ein vierter Sporoblast sich der Wahrnehmung entziehen könnte; ich habe daher die Beob-

zivel ; repetimos, por isso, a observação em multiplos cistos, especialmente naquelles com esporoblastas destacados, tendo sempre a impressão da existencia de trez unidades. Aliaz, condição biolojica similar é encontrada na *Benedenia eberthi*, coccidio, cujos esporoblastas se dividem em numero impar de esporozoitas, trez, o que indica, nas divizões do nucleo do esporoblasta, proceder identico ao observado no oocineto da *Adelea hartmanni*.

Para a formação de esporozoitas o nucleo do esporoblasta sofre primeira divizão no sentido do maior eixo, ficando os dois novos nucleos, a principio, com a cromatina condensada, colocados nos pólos opostos do esporoblasta (fig. 32). Cada novo nucleo se divide no sentido transversal, por processo de mitoze, com formação de um fuzo irregular de substancia acromatica, em cujo centro existe um filamento cromatico espesso (fig. 36). Sobre este e em torno delle, se dispõe toda a cromatina em alguns corpusculos (cromozomios?) quatro ou seis, de cuja divizão rezultam dois novos nucleos, nos quais a principio, a substancia cromatica se acha em duas porções, ligadas entre si por delgada fibrila (fig. 38). Os quatro nucleos, assim constituidos, são os nucleos dos quatro esporozoitas em que se divide o esporoblasta.

No esporio maduro os esporozoitas em numero de quatro, acham-se colocados de modo que as extremidades posteriores de dois delles ficam em contato com as anteriores dos dois outros. Os nucleos ficam dispostos em dois pares opostos, aprezentando-se o esporio como figura simetrica.

Dentro do esporio o plasma dos esporozoitas aprezenta grandes alveolos, o nucleo mostra espessa membrana e um diminuto cariozoma central (fig. 39). Em esporozoitas livres (fig. 40) a estrutura é a mesma, havendo apenas que referir a prezença de granulações de cromatina distintas na membrana nuclear, aspeto auzente nos esporozoitas ainda no esporocisto.

achtung in zahlreichen Cysten, besonders solchen mit abstehenden Sporoblasten wiederholt und stets den Eindruck erhalten, dass nur drei Einheiten vorhanden waren. Uebringens findet sich ein ähnliches biologisches Verhalten bei der *Benedenia eberthi* ; bei diesem Coccidium teilen sich die Sporoblasten in eine ungerade Anzahl von Sporozoiten, was bei der Teilung des Sporoblastenkernes ein ähnliches Verhalten andeutet, wie es bei der *Adelea hartmanni* vorliegt.

Bei Bildung der Sporozoiten erleidet der Sporoblastenkern eine erstmalige Teilung in der Richtung der längeren Axe, wobei die zwei neuen Kerne, deren Chromatin anfangs kondensiert ist, sich an den entgegengesetzten Polen des Sporoblasten lagern (Fig. 32). Jeder der beiden Tochterkerne teilt sich in querer Richtung durch eine Mitose mit Bildung einer unregelmässigen Spindel von achromatischer Substanz, in deren Centrum ein dicker Chromatinfaden liegt (Fig. 36). Auf und um diesen ordnet sich das ganze Chromatin in vier oder sechs Körperchen (Chromosomen?), aus deren Teilung zwei neue Kerne hervorgehen, in welchen anfangs die chromatische Substanz zwei mit einander durch eine dünne Faser verbundene Massen bildet (Fig. 38). Die vier so gebildeten Kerne entsprechen den vier Sporozoiten, in welche sich der Sporoblast teilt.

In der reifen Spore finden sich die vier Sporozoiten so gelagert, dass zwei derselben mit den Hinterenden die Vorderenden der beiden andern berühren. Die Kerne sind in zwei entgegengesetzte Paare geordnet, so dass die Spore eine symmetrische Figur zeigt.

Im Innern der Spore sieht man das grosswabige Plasma der Sporozoiten, während der Kern eine dicke Membran und ein kleines centrales Caryosom zeigt (Fig. 39). Die Struktur der freien Sporozoiten (Figur 40) ist dieselbe. Nur ist das Vorkommen von deutlichen Chromatinkörnchen in der Kernmembran zu erwähnen, welches bei den noch in den Sporocysten eingeschlossenen Sporozoiten vermisst wird.

CONCLUZÕES.

I. A *Adelea hartmanni* aprezenta, no ciclo esquizogonico, dimorfismo bem caraterizado.

II. A divizão multipla, na macro- e na microesquizogonia, ora se realiza por meio de mitozes homopolares do nucleo, ora pela rutura de um policario, com passajem para o plasma e multiplicação aí dos cariozomas (nucleos secundarios). No mesmo organismo pode ser observada a simultaneidade dos dois processos.

III. A associação dos gametócitos neste coccidio oferece, de curiozo, a prezença, na superficie dos organismos associados, de uma membrana. Serão cistos de associação, ou reprezentará a membrana externa os limites da celula epitelial em que tenham crecido os dois organismos?

IV. Na associação o numero de microgâmetas é as mais das vezes de dois, podendo haver cazos de quatro microgametócitos.

V. O numero de esporoblastas de cada cisto é, as mais das vezes, provavelmente sempre, de trez.

VI. Deverá esse coccidio, em vista do numero de esporoblastas contidos em cada cisto (trez), determinar a creação de novo genero? Os aspetos de semelhança que aprezenta, nos dois ciclos evolutivos, com a *Adelea ovata*, fazem com que o conservemos nesse genero, dedicando a especie ao nosso estimado mestre, Prof. Dr. MAX HARTMANN.

Concluindo, deixamos aqui os protestos de nosso reconhecimento ao diretor deste Instituto, o nosso mestre Dr. OSWALDO CRUZ, pelos conselhos que nos dispensou na elaboração deste trabalho.

Manguinhos, Maio de 1910.

SCHLUSSFOLGERUNGEN:

I. *Adelea Hartmanni* zeigt in ihrem Schizogoniecyclus einen ausgesprochenen Dimorphismus.

II. Die multiple Teilung bei der Makro- und Mikroschizogonie vollzieht sich bald durch eine homopolare Mitose des Kernes, bald durch Ruptur eines Polycaryon's unter Austreten der Caryosomen (Sekundarkerne) ins Plasma und nachfolgender Vermehrung daselbst. Die Gleichzeitigkeit beider Vorgänge kann bei demselben Organismus beobachtet werden.

III. Die Verbindung der Gametocyten zeigt bei diesem Coccidium die Eigentümlichkeit, dass an der Oberfläche der verbundenen Organismen eine Membran existiert. Es ist unentschieden, ob dies Copulationscysten sind oder ob die Membran die Grenze der Epithelialzelle darstellt, in welcher die Organismen heranwuchsen.

IV. Bei der Verbindung beträgt die Zahl der Mikrogametocyten meistens zwei, manchmal sogar vier.

V. Die Zahl der Sporoblasten in jeder Cyste beträgt gewöhnlich (und wahrscheinlich immer) drei.

VI. Man könnte daran denken für dieses Coccidium, mit Rücksicht auf die Zahl der Sporoblasten in jeder Cyste (drei), ein neues Genus aufzustellen. Die morphologische Aehnlichkeit, welche sein Entwicklungscyclus mit demjenigen der *Adelea ovata* zeigt, bewegt mich jedoch, es diesem Genus einzureihen, während ich die Species meinem verehrten Lehrer, Prof. MAX HARTMANN widme.

Zum Schlusse spreche ich noch dem Direktor dieses Institutes, meinem Lehrer Dr. OSWALDO CRUZ für die Ratschläge, welche er mir bei dem Abfassen dieser Arbeit erteilte, meinen besten Dank aus.

Manguinhos, Mai 1910.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS.

Estampas 11-15.

Macroesquizogonia.

Fig. 1. Macromerozoito.
Fig. de 2 a 5. Macroesquizontes.
Fig. 3. Promitoze do cariozoma.
Fig. 4. Mitoze do cariozoma com placas polares e placa equatorial.
Fig. 5. Mitoze do nucleo.
Fig. 6. Centriolo dividido num cariozoma.
Fig. 7. Macroesquizonte com diversos cariozomas.
Fig. 8 e 9. Macroesquizontes cujos nucleos contêm varios cariozomas.
Fig. 8 *a*. Mitoze do cariozoma. Centriolos muito claros.
Fig. de 9 *a* a 12. Multiplicação de nucleos e de cariozomas no plasma de macroesquizontes.
Fig. 13 e 13 *a*. Estádios que precedem a divizão do plasma.
Fig. 14 e 15. Fórmas segmentadas de macroesquizontes.

Microesquizogonia.

Fig. 16. Micromerozoito.
Fig. 17. Microesquizonte com policario.
Fig. 18. Rutura do nucleo do microesquizonte.
Fig. 19. Microesquizonte com diversos cariozomas no plasma.
Fig. 20. Multiplicação de cariozomas no plasma do microesquizonte.
Fig. 21. Forma segmentada na microesquizogonia.

Ciclo Sexuado.

Fig. 22 e 23. Macrogametócitos.
Fig. 24 e 25. Redução nuclear (maturação) dos macrogametócitos.
Fig. 26. Associação de dois microgametócitos com um macrogametócito. Penetração do microgâmeta. *Fuzo de copulação.*
Fig. 27. Divizão do nucleo do microgâmeta fecundado.
Fig. 28. Associação com quatro microgametócitos.
Fig. 29. Macrogâmeta fecundado com trez nucleos. Um dos nucleos permaneceu indivizo.
Fig. 30. Formação de esporoblastas. Microgametócito ainda aderente ao cisto, incluido na membrana externa.

ERKLAERUNG DER FIGUREN.

Tafeln 11-15.

Macroschizogonie.

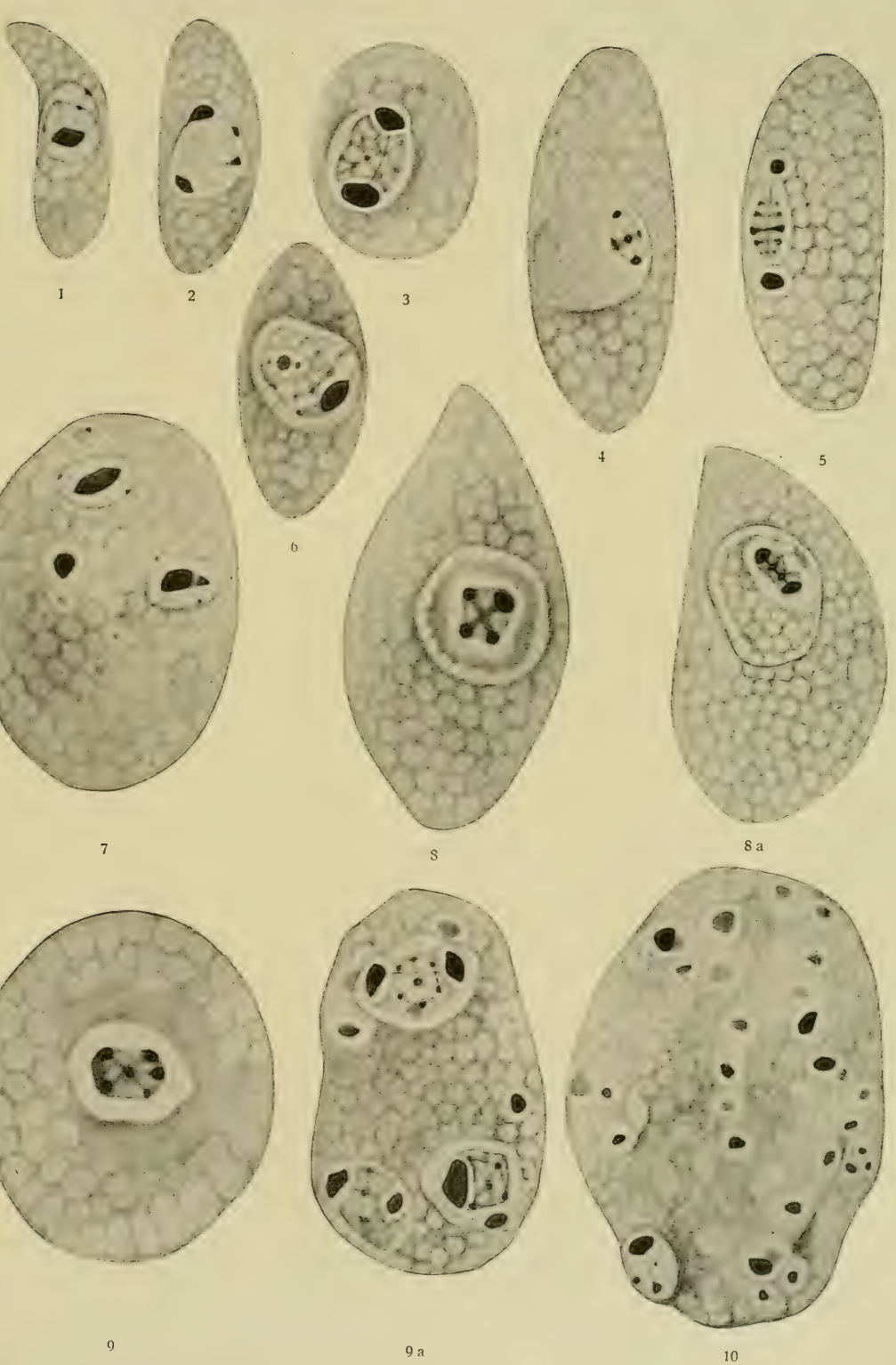
Fig. 1. Makromerozoit.
» 2-5. Makroschizonten.
» 3. Promitose des Caryosoms.
» 4. Mitose des Caryosoms mit Polarplatte.
» 5. Kernmitose.
» 6. Caryosom mit geteiltem Centriol.
» 7. Makroschizont mit mehreren Caryosomen.
» 8-9. Makroschizonten, deren Kerne mehrere Caryosomen enthalten.
» 9-12. Caryosommitose mit sehr deutlichen Centriolen.
» 9-12. Vermehrung der Kerne und Caryosomen im Plasma des Makroschizonten.
» 13-13 *a*. Stadien, die der Plasmateilung vorangehen.
» 14-15. Segmentierte Makroschizonten.

Microeschizogonie.

Fig. 16. Mikromerozoit.
» 17. Mikroschizont mit Polycarion.
» 18. Ruptur des Mikroschizontenkernes.
» 19. Mikroschizont mit mehreren Caryosomen im Plasma.
» 20. Vermehrung des Caryosoms im Plasma des Mikroschizonten.
» 21. Segmentierte Mikroschizogonieform.

Sexueller Cyclus.

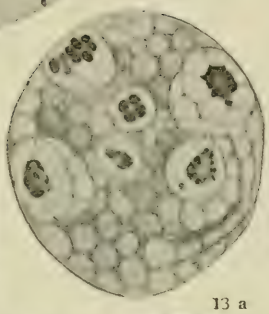
» 22-23. Makrogametocyten.
» 24-25. Kernreduktion (Reifung) des Makrogametocyten.
» 26. Vireinigung zweier Mikrogametocyten mit einem Makrogameten. Kopulationsspindel.
Fig. 27. Kernteilung des befruchteten Makrogameten.
» 28. Verbindung mit vier Mikrogametocyten.
» 29. Befruchteter Makrogamet mit drei Kernen; einer derselben verbleibt ungeteilt.
» 30. Bildung von Sporoblasten. Mikrogametocyt der Cyste noch anhängend und von der Aussenmembran umgeben.


1
2
3
4
5
6
7
8
8 a
9
9 a
10

11

13

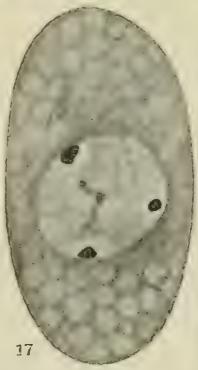
12



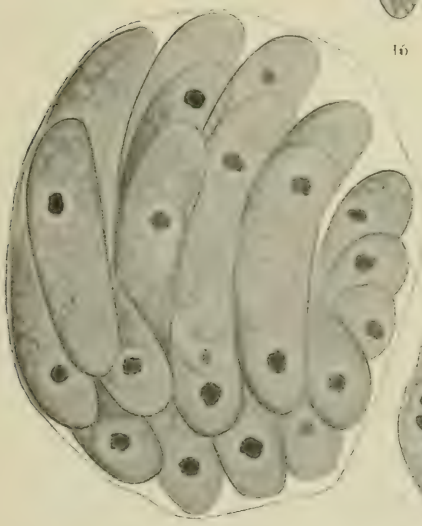
13 a

14

16

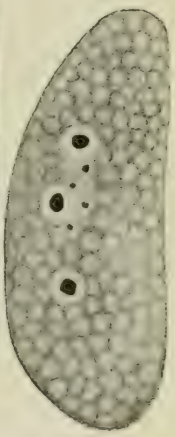


17



15

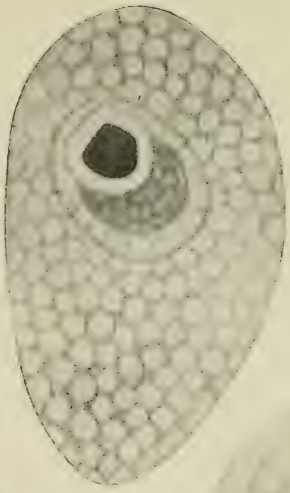
18



19

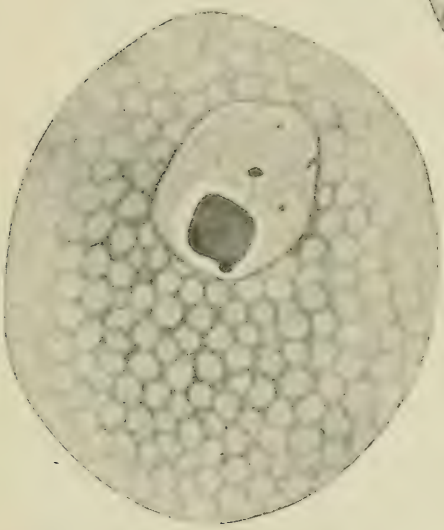
20

21

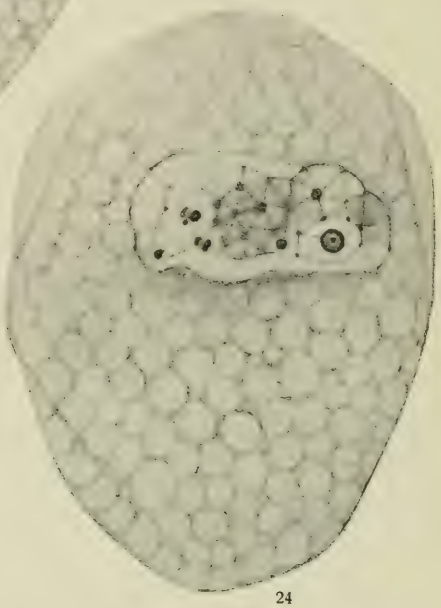


22

21 a

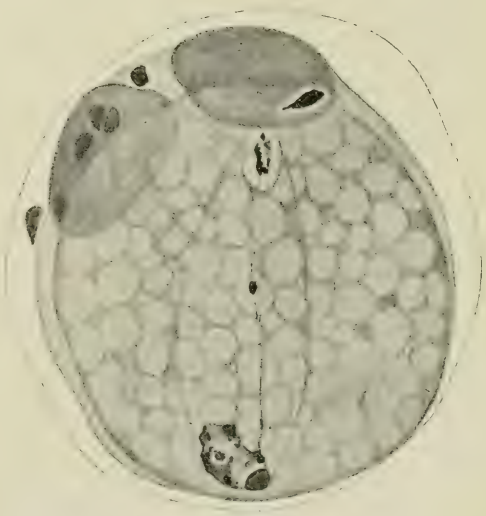


23

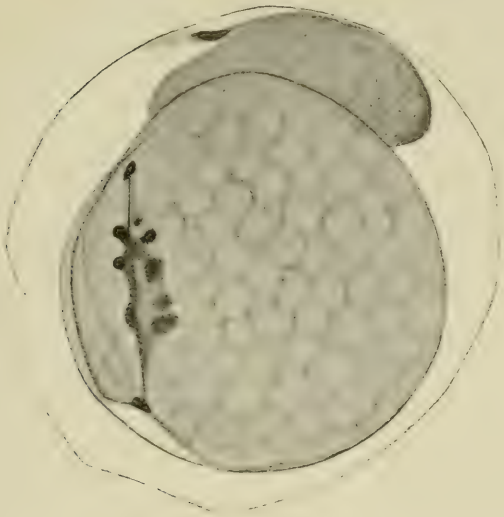


24

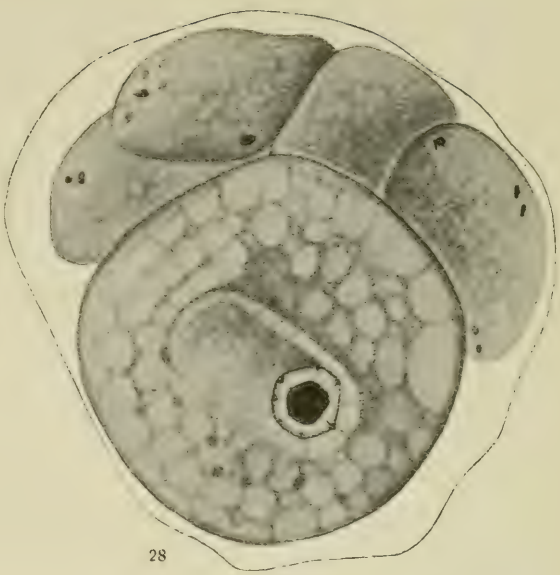
25



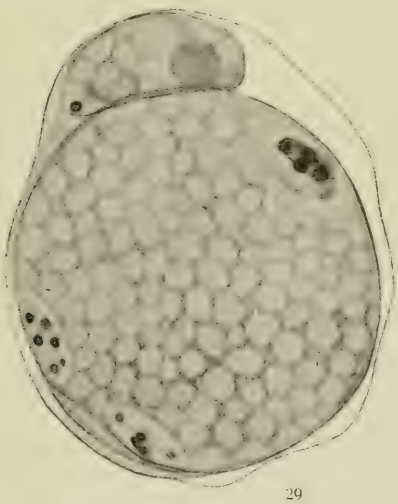
26



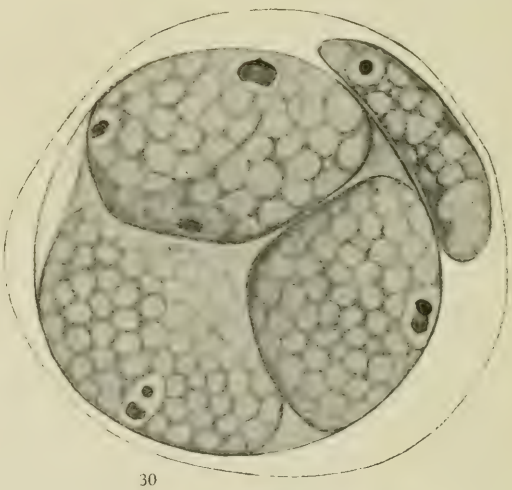
27



28

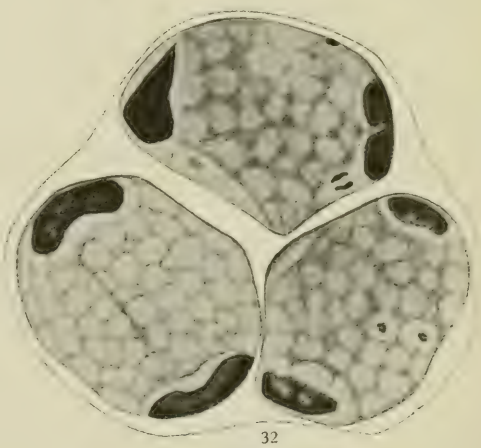


29

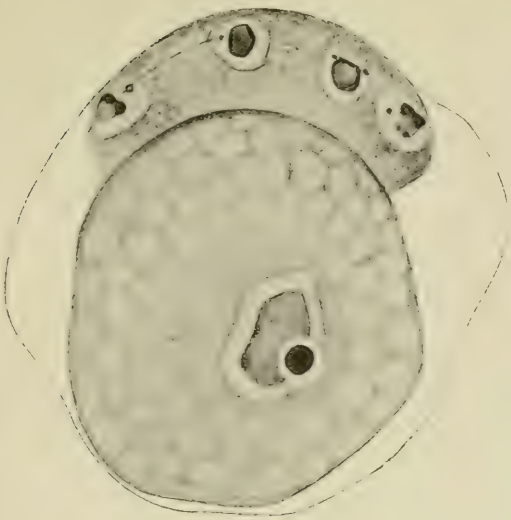


30

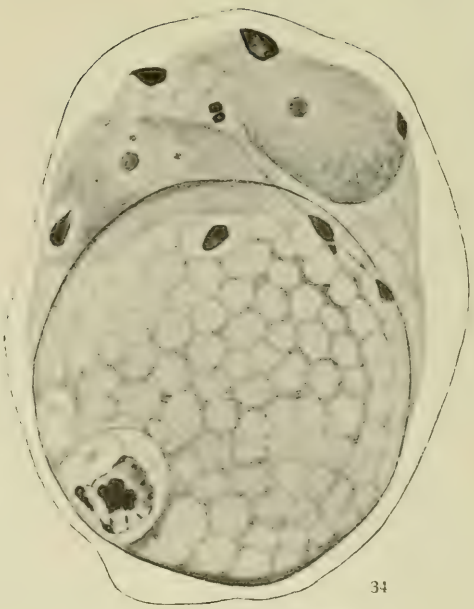
31



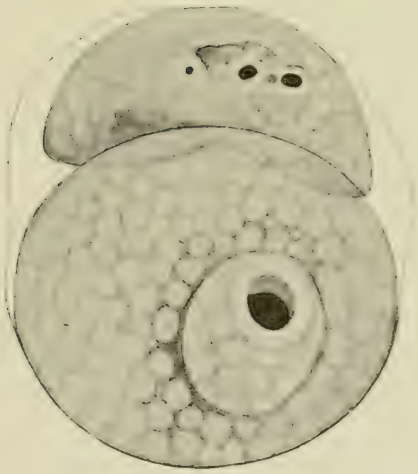
32



33

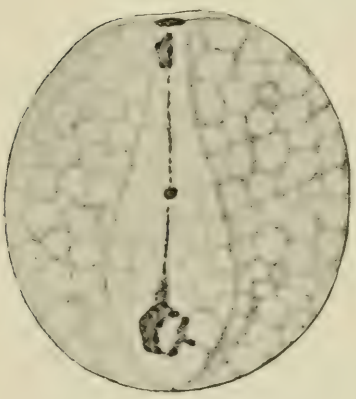


34



35

36



37

38

39

40

Fig. 31.	Divizão do nucleo do esporoblasta.	» 31.	Kernteilung des Sporoblasten.
Fig. 32.	Esporoblastas com duas massas cromaticas nos pólos.	» 32.	Sporoblasten mit zwei Chromatinmassen an den Polen.
Fig. 33.	Microgametócito com quatro nucleos (ou melhor quatro cariozomas).	» 33.	Mikrogametocyt mit vier Kernen (oder besser vier Caryosomen).
Fig. 34.	Fórma dos microgâmetas.	» 34.	Mikrogametenformen.
Fig. 35.	Microgametócito com policario.	» 35.	Mikrogametocyt mit Polycaryon.
Fig. 36.	Segunda divizão dos nucleos dos esporoblastas.	» 36.	Zweite Teilung der Sporoblastenkerne.
Fig. 37.	Fuzo de copulação do nucleo de macrogâmeta livre.	» 37.	Kopulationsspindel des Kernes des freien Makrogameten.
Fig. 38.	Esporoblastas escapados do cisto, cada um delles com quatro nucleos.	» 38.	Aus der Cyste ausgetretene Sporoblasten, jeder derselben mit vier Kernen.
Fig. 39.	Esporio com quatro esporozoitas.	» 39.	Spore mit vier Sporozoiten.
Fig. 40.	Esporozoita livre.	» 40.	Freier Sporozoit.

BIBLIOGRAFIA.

DOBELL, C. C. ..... — Observations on the life and history of *Adelea ovata* — with a note on a new Gregarine f. the gut of *Lithobius forficatus*. Proceed. Royal Soc. B. Vol. 79.

JOLLOS, V. ..... 1909 Multiple Teilung und Reduktion bei *Adelea ovata*. Arch. f. Prot. Bd. XV.

LÉGER, L. ..... 1898 Sur la morphologie et le développement des microgamètes des coccidies. Arch. de Zool. exp. et gén. Notes et Revue. Vol. 6.

LÉGER, L. ..... 1904 Sporozoaires parasites de l'Embia soliezi, RAMBUR. Arch. f. Protistenkunde. Vol. 3.

MINCHIN, E. A. ..... 1903 Sporozoa. In Lankester's Treatise on Zoology.

MOROFF, TH. ..... 1907 Untersuchungen über Coccidien. *Adelea zonula* nov. sp. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 8.

NAEGLER, K. ..... 1909 Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amoeben. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 15.

PÉREZ, C. ..... 1903 Le cycle evolutif de l'*Adelea mesnili*, coccidie coelomique, parasite d'un lepidoptère. Arch. f. Protistenkunde. Vol. 2.

SCHAUDINN, F. ..... 1900 Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien. Zool. Jahrb. Abth. f. Anat. Vol. 13.

SIEDLECKI, M. ..... 1898 Étude cytologique et cycle évolutif de la coccidiede la Seiche. Ann. de l'Inst. Pasteur. Vol. 12.

SIEDLECKI, M. ..... 1899 Étude cytologique et cycle évolutif de *Adelea ovata*, Schneider. Ann. de l'Inst. Pasteur. Vol. 13.

Estudos sobre a tuberculoze

PELO

Dr. A. Fontes,

Assistente.

(Com as estampas 16 e 17.)

Studien ueber Tuberculose

VON

Dr. A. Fontes,

Assistenten am Institute.

(Hierzu Tafeln 16 und 17.)

SUMARIO: — Interesse do estudo das granulações do bacilo de KOCH. — Orientação para esse estudo. — Diferença de fórma, volume e numero entre as granulações. — Reações córantes: GRAM, GIEMSA, DELAFIELD, HEIDENHAIN e ROSENBUSCH. — Coloração pelo LUGOL. — Coloração vital. — Função da granulação no bacilo. — Citolojia do bacilo. — Filtração do puz tuberculozo. — Verificação das granulações no puz filtrado em véla BERKEFELD. — Substancia tuberculijena. — Reação do organismo infetado. — Natureza quimica da granulação. — Precipitação dos sais soluveis de calcio *in vitro* sob a forma de fosfátos. — Dezaparecimento das granulações em virtude dessa reação. — Bacilo-cazeina de AUCLAIR e PARIS e granulação do bacilo. — Transmissão de tuberculoze em serie por inoculação de granulações. — Tuberculoze latente. — Concluzões. — Bibliografia.

O interesse do estudo das granulações do bacilo de KOCH sobresáe de varios fatos que se verificam por observação dellas.

A grande rezistencia que essas granulações aprezentam ás cauzas de destruição do bacilo, a constancia de sua prezença no

INHALTSÜBERSICHT: — Bedeutung des Studiums der Granulationen des KOCH'schen Bacillus. — Gesichtspunkte für dieses Studium. — Unterschied der verschiedenen Granula nach Form, Grösse und Zahl. — Färbereactionen: GRAM, GIEMSA, DELAFIELD, HEIDENHAIN und ROSENBUSCH. — Färbung mit Lugolscher Lösung. — Vitale Färbung. — Funktionen der Granula in den Bazillen. — Cytologie der Bazillen. — Filtration des tuberculösen Eiters. — Nachweis der Granula im Eiter nach Filtration durch BERKEFELD'sche Filter. — Tuberkelerzeugende Substanz. — Reaktion des inficirten Organismus. — Chemische Natur der Granula. — Precipitation *in vitro* der löslichen Kalksalze unter der Form von Phosphaten. — Verschwinden der Granula in Folge dieser Reaktion. — Bacillocasein von AUCLAIR und PARIS und die Granulation der Bazillen. — Uebertragung der Tuberculose in Serien durch Einimpfung der Granula. — Latente Tuberculose. — Schlussfolgerungen. — Bibliographie.

Die Bedeutung des Studiums der Granula in den KOCH'schen Bazillen erhellt aus verschiedenen Tatsachen, die man bei ihrer Beobachtung erkennt.

Die bedeutende Resistenz dieser Granula gegen bazillenzerstörende Einflüsse, ihr beständiges Vorkommen in tuberculösem

material de natureza tuberculoza, onde mesmo não se encontram bacilos inteiros, a variabilidade do numero, da forma e do volume são fatos que justificam estudo um pouco mais cuidadozo da natureza dessas granulações. Ainda mais: essas granulações variam em volume, em forma e em numero não só nos bacilos da tuberculoze como nos para-tuberculozos, no da lepra e em geral nas estreptotriqueas. E' variavel ainda a dispozição que ocupam no bacilo da tuberculoze (central, excentrica, polar, bipolar). No estudo comparativo dessas granulações com as dos acido-rezistentes comuns e as do bacilo de HANSEN observámos que diferenças mais notaveis existem entre as granulações do bacilo da tuberculoze e as do bacilo da lepra, que entre estas e as acido-rezistentes. Pelo menos entre as amostras estudadas a estrutura do bacilo de HANSEN se aproxima mais da estrutura do da pseudo-tuberculoze BINOT que da do bacilo da tuberculoze verdadeira.

E' assim que os bacilos da lepra córados pelo metodo que anteriormente aconselhei (1908 e 1909) se aprezentam quazi que em sua totalidade córados excluzivamente pelo cristal-violeta que impregnou todo o corpo do bacilo; em numero muito menor aprezentam-se bacilos granulares com espaços claros entre as granulações. A razão desse fenomeno atribue-se ao estado de morte da maioria dos bacilos nos lepromas. Infere-se daí ainda que a perda da alcool-rezistencia foi orijinada pela hidrólize das substancias de natureza graxa existentes no bacilo, como sucede com os bacilos de KOCH no puz tuberculozo e que é determinada pla *tuberculo-ciraze*, fermento que encontrámos no puz tuberculozo e cuja natureza determinámos em trabalhos anteriores (1908 e 1909). Esse mesmo fermento foi encontrado tambem no puz tuberculozo por BERGEL (1909) que estudou a sua ação sobre a cêra das abelhas, e recentemente FIESSINGER e PIERRE MARIE (1909) confirmaram esses trabalhos e sem que delles tivessem conhecimento, reconhecendo por outro caminho a existencia

Material, in welchem sich keine ganzen Bazillen finden, ihr Schwanken in Zahl, Form und Grösse sind Umstände, welche ein etwas sorgfältigeres Studium der Natur dieser Granulationen rechtfertigen. Ueberdiess findet sich ein solcher Wechsel in Grösse, Form und Zahl nicht nur bei den Tuberkelbazillen, sondern auch bei den paratuberculösen, bei denen der Lepra und im Allgemeinen bei den *Streprotricheen*. Auch die Lagerung im Tuberkelbazillus wechselt; sie kann central, excentrisch, polar oder bipolar sein.

Beim Vergleiche dieser Granula mit denjenigen der gewöhnlichen säurefesten und des HANSEN'schen Bazillus beobachteten wir auffallendere Unterschiede in den Körnern des Tuberkel- und Leprabazillus, als zwischen diesem und den säurefesten. Wenigstens in den untersuchten Proben näherte sich die Struktur des HANSEN'schen Bazillus mehr derjenigen des Bazillus der Pseudotuberculose von BINOT, als derjenigen des ächten Leprabazillus.

So sieht man, dass bei Färbung nach der von mir 1908 und 1909 empfohlenen Methode, die Leprabazillen fast alle ausschliesslich die Farbe des Krystallvioletts zeigen, welche den ganzen Bazillenkörper durchtränkt hat; in weit geringerer Zahl zeigen sich körnige Bazillen mit hellen Zwischenräumen zwischen den Granulationen. Die Ursache dieser Erscheinung sucht man darin, dass die Bazillen der Leprome zum grössten Teile abgestorben sind. Man schliesst daraus, dass der Verlust der Alkoholresistenz durch die Hydrolyse der im Bazillus vorhandenen fetthaltigen Substanzen entsteht, wie es bei den KOCH'schen Bazillen im tuberculösen Eiter der Fall ist, wo sie durch die *Tuberculocirase* bewirkt wird; dieses Ferment habe ich im tuberkulösen Eiter aufgefunden und seine Natur in einer früheren Arbeit festgestellt. (1908 und 1909). Auch BERGEL fand dieses Ferment im tuberkulösen Eiter und studierte seine Einwirkung auf Bienenwachs; neuerdings bestätigten auch FIESSINGER und PIERRE MARIE diese Arbeiten, ohne sie zu kennen,

nos linfócitos de fermento saponificador da cêra das abelhas.

Na lepra a analojia prevê que se observe o mesmo fenomeno que na tuberculoze, tanto mais quanto rezulta da observação de Mac-Leod (1909) que nos lepromas os bacilos de Hansen em sua maioria se acham mortos.

Nas lezões tuberculozas, entretanto, e mesmo nas culturas, na maioria senão quazi na totalidade, os bacilos quando perdem a alcool-rezistencia, aprezentam sómente as granulações córadas em violeta e separadas por espaços claros, ao contrario do que sucede na maioria dos bacilos nos lepromas e nas pseudo-tuberculozes (amostras Binot, Moeller, Ficker e Tobler). O bacilo da tuberculoze só se aprezenta intensamente córado em violeta nas formas de dejeneração muito acentuada quando existem em lezões tuberculozas ou nas formas muito novas quando examinadas em culturas.

Isto rezulta não só do volume das granulações como do estado de condensação em que se acha no interior dos bacilos a substancia que as constitue e da forma que ellas aprezentam apoz a fixação e coloração. Sempre granulares, esfericas na tuberculoze, mostram-se redondas, ovoides ou levemente angulares na lepra e nos acido-rezistentes. Nas formas actinomicoticas da tuberculoze vêm-se granulações em forma de clava ou ovoides.

Na tuberculoze as granulações exercem função essencial á vida do bacilo. A variabilidade do seu numero e volume, não só em relação aos outros bacilos como ao proprio em que estão incluidas, da sua colocação no interior dos bacilos (bipolar, central, levemente afastadas do eixo do bacilo), e a existencia de granulações em liberdade nas culturas homojeneas, aprezentando uma orla de substancia que se mostra alcool-rezistente, a auzencia de granulações limitadas aos bacilos, ainda que raros, que tomam o Gram intensa-

indem sie auf anderem Wege in den Lymphocyten das Vorkommen eines Bienenwachs verseifenden Fermentes erkannten.

Bei der Lepra kann man in analoger Weise das Vorkommen derselben Erscheinung erwarten, um so mehr, als aus den Beobachtungen von Mac-Leod (1909) hervorgeht, dass in den Lepromen die Hansen'schen Bazillen der Mehrzahl nach abgestorben sind.

Dagegen zeigen in den tuberkulösen Läsionen und besonders in den Kulturen die meisten oder nahezu alle Bazillen, wenn sie die Alkoholresistenz verlieren, die Granula violett gefärbt und durch helle Zwischenräume getrennt, im Gegensatz zu dem, was in meisten Bazillen bei Lepromen und Pseudotuberkulose der Fall ist (Bazillenstämme von Binot, Moeller, Ficker und Tobler). Der Tuberkelbazillus zeigt eine intensive Violettfärbung in tuberkulösen Läsionen nur bei sehr ausgesprochenen Degenerationsformen und in Kulturen nur bei sehr jungen Formen.

Es geht dies nicht nur aus dem Volumen der Granula hervor, sondern auch aus dem Zustande der Verdichtung, in welchem die sie bildende Substanz im Innern der Bazillen vorkömmt und der Form, welche sie nach Fixierung und Färbung zeigen. Bei der Tuberkulose immer körnig und rund, zeigen sie sich bei Lepra- und säurefesten Bazillen rund, länglich oder leicht eckig. Bei den aktinomykotischen Formen der Tuberkulose zeigen die Granula eine Keulen- oder Eiform.

Bei der Tuberkulose haben die Granula eine für das Leben des Bazillus wesentliche Funktion. Ihre Veränderlichkeit in Zahl und Grösse, nicht nur den anderen Bazillen gegenüber, sondern auch in Beziehung zu dem Bazilllus, welcher sie einschliesst, und ihver Lagerung im Innern der Bazillen (bipolar, central und etwas ausserhalb der Axe des Bazillus), sowie das Vorkommen von freien Granulis in homogenen Kulturen, welche einen Saum von alkoholbeständiger Substanz aufweisen, das Fehlen von Körnern, welches sich auf die

mente, além disso, a concordancia de paralelismo das granulações nos grumos bacilares são razões que militam pela necessidade da granulação para a vida do bacilo.

Essas granulações são córaveis pelos metodos de Giemsa, Rosenbusch, Delafield e Heidenhain.

O metodo de Giemsa merece alguns reparos especiais. Si se faz a fixação pelo alcool absoluto as granulações não se córam bem; o bacilo aprezenta-se com manchas vermelhas no seu interior; a forma granular não é, porém, nitida. A fixação pelo calor revela a granulação, ora córada em vermelho intenso, ora em vermelho violaceo. O metodo de Giemsa novo (fixação a humido) (1909) mostrou-nos nos bacilos massas córadas em vermelho, que aprezentavam granulações mais intensamente córadas. Dá, entretanto, poucas minucias.

O metodo de Rosenbusch presta-se pouco; os de Heidenhain e Delafield córam melhor.

Poder-se-ia julgar ser a granulação um produto artificial em virtude da tecnica de fixação (quando se não uzasse a fixação a humido), se ellas não fossem perfeitamente viziveis pelo exame a fresco, principalmente, se se juntar á cultura a examinar um pouco de Lugol.

Ainda nas preparações de culturas, quando córadas pelo Giemsa, foi a nossa atenção despertada para o fato de aparecerem bacilos, inteiramente córados em azul, onde se não viam granulações. Como não vissemos isto nas culturas recentes em batata, e, como tivessemos experimentado com culturas homojeneas antigas, interpretámos o fato, como sendo devido á morte desses bacilos.

Nas preparações fixadas pelo calor o Lugol córa as granulações em violeta intenso, e posto em contato com emulsão de bacilos o reajente se descora de todo. Que estas granulações não possuem revestimento céreo ou graxo, quando exis-

wenigen Bazillen beschränkt, welche sich intensiv nach Gram färben, ausserdem die Uebereinstimmung im Parallelismus der Granulationen in den Bazillenklümpchen, sind Gründe, welche zu Gunsten der Unentbehrlichkeit der Granula für das Leben der Bazillen sprechen.

Diese Granula lassen sich nach den Methoden von Giemsa, Rosenbusch, Delafield und Heidenhain färben.

Ueber die Methode von Giemsa ist Folgendes zu bemerken: Geschieht die Fixation durch absoluten Alkohol, so färben sich die Granula nicht gut; der Bazillus zeigt zwar rote Flecke in seinem Innern, aber die Körnchenform ist nicht deutlich. Dagegen zeigt die Fixation durch Hitze die Granula bald intensiv rot, bald violettrot gefärbt. Die neue Methode (mit feuchter Fixierung) von Giemsa (1909) zeigte mir im Innern der Bazillen rotgefärbte Massen mit stärker gefärbten Körnchen, giebt jedoch wenig detaillierte Bilder.

Die Methode von Rosenbusch eignet sich sehr wenig; die von Heidenhain und Delafield färben besser.

Wenn man keine feuchte Fixierung anwendet, könnte man die Körnchen für ein durch die Fixierung erzeugtes Kunstprodukt ansehen, wären sie nicht bei Untersuchung frischer Präparate deutlich wahrnehmbar, besonders nach dem Zusatz von etwas Lugol'scher Lösung.

In nach Giemsa gefärbten Präparaten von Kulturen fiel mir noch auf, dass ganz blau gefärbte Bazillen vorkamen, in denen man keine Granula sah. Da ich dies in frischen Kartoffelkulturen nicht beobachtet hatte und diese Untersuchung alte homogene Kulturen betraf, erklärte ich mir die Sache so, dass diese Bazillen abgestorben wären.

In durch Hitze fixierten Präparaten färbt Lugol'sche Lösung die Granula intensiv violett und dasselbe Reagens entfärbt sich vollständig, wenn es mit einer Bazillenemulsion in Berührung gebracht wird. Dass diese Granula im Innern der Bazillen keine wachs- oder fettartige

tentes no corpo do bacilo, rezulta da observação em gota pendente de cultura homojenea, uzando-se a coloração vital com o azul de metilenio. Vê-se aí que as granulações pouco a pouco aparecem córadas em azul palido, progressivamente intenso e não só ellas como tambem bacilos nos quais a substancia que constitue as granulações está difuza, sem diferenciação.

Nas culturas homojeneas antigas a maioria dos bacilos não se córa; isso facilmente se compreende atendendo á constituição quimica do corpo dos bacilos da tuberculoze, extremamente ricos em substancias de natureza graxa.

O exame da cultura em gota pendente não mostrou de modo nitido evolução na forma da granulação. Tampouco conseguimos assistir á libertação da granulação; entretanto vêm-se numerozas formas bacilares onde as granulações se mostram apensas, fazendo saliencia ao corpo do bacilo de sorte que nas formas muito granulozas a aparencia dellas assemelha um tronco carregado de frutas sésseis, como se vê na fig. 1. de uma preparação fixada a humido pelo sublimado alcool e córada pelo meu metodo. Algumas vezes em preparados secos córados encontrámos formas bacilares com falta de uma ou outra granulação. Essas formas mostram espaços claros, não córados nos pontos onde deviam existir as granulações, fato, que junto á existencia de granulações livres na cultura ou no produto patolojico, faz pensar que tenham ellas sido dezagregadas dos bacilos. Indica ainda, haver qualquer coincidencia na existencia da granulação e na divizão do bacilo, o fato de, nas formas ramificadas, ricas nas granulações mais volumozas, aprezentarem-se as granulações, precizamente no ponto de dicotomia. Algumas vezes tal encontrámos em escarro de individuos tuberculozos sujeitos ao tratamento pela tuberculina (T. O. A.).

Procurámos então elucidar a função que a granulação exerce na biolojia do bacilo e ensaiámos fazer a citolojia deste.

Hülle besitzen, kann man aus der Beobachtung einer homogenen Kultur im hängenden Tropfen folgern, wenn man die vitale Methylenblaufärbung anwendet. Man sieht die Granula sich nach und nach, erst blässer und dann intensiv, blau färben und nicht nur diese, sondern auch die Bazillen, in welchen die körnchenbildende Substanz diffus und nicht differenziert vorkömmt.

In alten homogenen Kulturen färbt sich die Mehrzahl der Bazillen nicht, was sich leicht durch die chemische Zusammensetzung der an fettartigen Substanzen äusserst reichen Bazillen erklärt.

Die Beobachtung der Kultur im hängenden Tropfen liess keine deutliche Entwicklung der Körnchenform erkennen; auch gelang es mir nicht, das Freiwerden derselben zu beobachten. Man sieht jedoch zahlreiche Bazillenformen, denen die Granula angelagert sind, indem sie aus ihrem Leibe vorragen, so dass stark körnige Formen an einem mit sitzenden Früchten beladenen Stamm erinnern können, wie Fig. 1 zeigt, welche ein mit Sublimatalkohol fixiertes und nach meiner Methode gefärbtes Präparat darstellt. In gefärbten Trockenpräparaten fand ich manchmal Bazillenformen, bei denen das eine oder andere Körnchen fehlte; dieselben zeigten helle Lücken an den Stellen, wo die Granula sitzen sollten. Dieser Umstand, verbunden mit dem Vorkommen von freien Körnchen in Kulturen und pathologischen Produkten, lässt vermuten, dass letztere aus den Bazillen ausgestossen wurden. Auch der Umstand, dass in verzweigten Formen die an besonders grossen Körnchen reich sind, letztere gerade am Punkte der Dichotomie auftreten, weist auf eine Beziehung zwischen dem Vorkommen der Granula und der Teilung der Bazillen. Man beobachtet dies manchmal im Auswurfe von Tuberkulösen, welche mit Tuberculin (T. O. A.) behandelt werden.

Ich habe dann versucht die Funktion aufzuklären, welche die Körnchen in der Biologie des Bazillus ausüben und die Cytologie des letzteren zu studieren und zwar

Para este fim estudámol-o em culturas e em produtos patolojicos. Uzámos a tecnica de fixação humida de SCHAUDINN (sublimado-alcool) e os metodos de hematoxilina (metodo DELAFIELD e HEIDENHAIN.) Alem destes, uzámos o metodo de coloração que propuzemos em trabalho anterior e que dá a dupla coloração do bacilo.

Procedemos do seguinte modo: uma amostra de tuberculoze humana, proveniente do Instituto de Hijiene de Berlim, foi adaptada á cultura homojenea. As preparações feitas em laminula eram, logo apoz a distensão do material, fixadas em sublimado-alcool por 15 minutos. Passavam depois para o alcool a 70° onde permaneciam *no minimo* meia hora e daí para a agua (5 a 10 minutos) e depois para o seguinte banho córante (que reconhecemos como o melhor, apoz inumeros errores:

Hematoxilina DELAFIELD	50	gotas
Agua	50	ccm.

Córar por 1 hora no minimo ou (o que é preferivel).

Hematoxilina DELAFIELD	1	ccm.
Agua	20	ccm.

Corar durante 24 horas.

Diferenciar na seguinte mistura:

Alcool a 95°	50	ccm.
Acido cloridrico	3	gotas

Durante 20 a 30 minutos.

Este metodo nos deu bons rezultados. Compreende-se, entretanto que possa deixar de satisfazer, quando aplicado a amostras diferentes das que foram uzadas no prezente trabalho. Variarão naturalmente o tempo de coloração, a concentração do banho córante e o tempo de diferenciação com o gráo de rezistencia que o bacilo opuzer á penetração do corante, assim como o melhor gráo de diferencia-

sowohl in Kulturen, als an pathologischen Produkten. Ich wandte die feuchte Fixierung mit Sublimatalkohol nach SCHAUDINN und die Hämatoxylinfärbungen nach DELAFIELD und HEIDENHAIN an. Ausserdem gebrauchte ich auch die von mir in einer früheren Arbeit vorgeschlagene Färbemethode, welche eine Doppelfärbung des Bazillus giebt.

Das Verfahren war wie folgt: Ein Stamm von menschlicher Tuberculose. aus dem Hygieneinstitut von Berlin wurde zu homogener Kultur gebracht. Die auf Deckgläschen hergestellten Ausstrichspräparate wurden sofort für 15 Minuten in Sublimatalkohol gelegt; von da kamen sie für eine halbe Stunde oder länger in Alkohol von 70°, von diesem für 5—10 Minuten in Wasser und endlich in die nachfolgende Färbelösung, welche ich nach unzähligen Misserfolgen als die beste erkannt hatte:

Hämatoxylinlösung nach DELAFIELD	50	Tropfen
Wasser	20	ccm.

Färbung während einer Stunde im Minimum oder noch besser:

Hämatoxylinlösung nach DELAFIELD	1	ccm.
Wasser	20	ccm.

Färbung während 24 Stunden.

Die Differenzierung erfolgt in folgender Mischung:

Alkohol (95°)	50	ccm.
Salzsäure	3	Tropfen

Einwirkung 20—30 Minuten.

Diese Methode gab mir gute Resultate. Doch wird man verstehen, dass sie vielleicht weniger befriedigt, wenn sie auf andere, als die bei meiner Arbeit gebrauchten Stämme angewandt wird. Es müssen dann natürlicherweise die Färbungszeit, die Konzentration der Farblösung und die Zeit der Differenzierung nach dem Grade des Widerstandes, welchen

ção somente poderá ser determinado por ensaios previos. O mesmo se aplica á hematoxilina de HEIDENHAIN que empregámos sob a seguinte tecnica :

Fixação : como no metodo anterior.
Alcool a 70° — meia hora.
Agua — 5 minutos.

Mordente :

Solução de alumen ferreo (a 3,5 %) *6 horas* no minimo,

Lavajem em agua. —

Solução córante :

Hematoxilina HEIDENHAIN. 1 cc.
Agua ..... 20 cc.

Corar durante 24 horas, diferenciar em :
Solução de alumen ferreo (a 1 %) 15 a 20 minutos.

Dezidratar — Fechar em balsamo.

Pelas preparações assim feitas pudemos verificar, ser a função que a granulação exerce, não só importante, como *essencial*, á vida do bacilo. Acompanhando o dezenvolvimento das culturas homojeneas vemos que a granulação, por processo de divizão, analogo á gemulação, dá orijem a a outras granulações, que por sua vez se tornam centros de reprodução. Durante certa faze de dezenvolvimento da cultura, essas granulações conservam-se ligadas por delgados filamentos, constituindo grumos (Est. 16, Fig. 2 e 2*a*), o que explica (juntamente com o meio de reprodução acima referido) tanto o paralelismo dos bacilos nos grumos, como a correspondencia linear e as diferenças de volume das granulações. Com o dezenvolvimento da cultura e conseguintemente com o dezenvolvimento do bacilo, o depozito de substancias diversas, por elle elaboradas, principalmente os corpos de natureza graxa, sobrecarregam-no, de modo a se romperem os filamentos de ligação, e a divizão se faz em um ou outro sentido, de acordo com um plano de

der Bazillus der Färbung entgegensetzt, wechseln, ebenso kann auch das Optimum der Differenzierung nur durch Vorversuche festgestellt werden. Dasselbe gilt vom Hämatoxylin nach HEIDENHAIN, bei welchem ich folgendes Verfahren anwandte :

Fixation wie oben.
Alkohol (70°) — 30 Minuten.
Wasser — 5 Minuten.

Beize :

Eisenalaunlösung (3,5%) im Minimum 6 Stunden lang, dann waschen im Wasser, von da in folgende Färbelösung :

Hämatoxylinlösung nach HEIDENHAIN ..... 1 ccm.
Wasser ..... 20 ccm.

Färbung während 24 Stunden, dann Differenzierung in : Eisenalaunlösung (1%) während 15-20 Minuten, hierauf Entwässern und Einschluss in Kanadabalsam.

An so hergestellten Präparaten konnte ich sehen, dass die Funktion der Granula eine nicht bloss wichtige, sondern selbst für das Leben des Bezillus unentbehrliche ist. Verfolgt man die Entwicklung der homogenen Kulturen, so sieht man, dass die Granula durch einen Teilungsprozess, welcher der Sprossung analog ist, neue Granula entstehen lassen, welche wiederum zu Reproduktionzentren werden. Während einer gewissen Entwicklungsperiode der Kultur bleiben diese Granula durch zarte Fäden vereinigt und bilden kleine Massen (Fig. 2 und 2 a), was, in Kombination mit der geschilderten Vermehrungsweise, erklärt, warum die Bazillen in den Masse parallel gelagert sind und die Granula sich linienweise entsprechen und eine verschiedene Grösse zeigen. Bei fortschreitender Entwicklung der Kulturen und der darin enthaltenen Bazillen werden letztere durch die, in ihnen gebildeten und abgelagerten, Substanzen von vorwiegend fettiger Natur überladen, so dass die verbindenden Fäden brechen und die Teilung, in Uebereinstimmung mit der Teilungsebene, welche

divizão que separa os corpos dos bacilos (Est. 16, Figs. 3 e 3 *a*). Aí mesmo se vê a correspondencia absoluta das granulações e a delgada camada de substancia que une os corpos bacilares.

Ponto importante a esclarecer é a divizão da granulação. Nas preparações fortemente diferenciadas observam-se granulações refrinjentes, *nas quais nitidamente se vê um plano de divizão, de modo a se formarem duas porções deziguais, que aprezentam as bordas córadas mostrando haver aí condensação de substancia cromatica;* o centro da granulação aprezenta-se então *como ponto não córado* (Est. 16, Figs. 4 e 5). Em virtude dessa divizão dezigual, é, que se nota nos grumos sempre uma granulação maior que todas as outras (Est. 16, Fig. 5). Explicar-se-ia esse fato considerando a granulação como sistema cromidial, já orientado para a subsequente divizão e que acarretasse nesse processo a porção de plasma, conveniente á ultimação delle para formação do organismo novo. A demonstração disso é-nos dada pela observação não só nas culturas como nos produtos patolojicos, de formas granulares cercadas de delgada camada de substancia onde pelas reações córantes se nota já a formação de corpos alcool-rezistentes (Est. 16, Fig. 6), que sómente podem ser interpretados como produtos de elaboração celular. Seria, como diz Mesnil (1905) quando se refere ao trabalho de Schaudinn sobre a *Ameba testacea*, seria um *cromidio morfolojicamente* homologo ao do *Actinospherium*, que, porém, *fiziolojicamente* é de natureza diversa por possuir função reprodutora e não vejetativa.

Que a granulação se divide mesmo *izolada do corpo do bacilo* parece-nos fóra de duvida pela observação das figuras 7, 7*a*, e 7*b* da Est. 16, e admitindo isso que nos parece provado, a granulação não só reprezentaria *o centro de reprodução* do bacilo como poderia ser considerada como a unidade vital; isto é, cada granulação reprezentaria uma unidade viva. Cada bacilo como hoje em dia é considerado pas-

die Bazillen trennt, in einer oder der anderen Richtung erfolgt (Fig. 3, 3a), wobei man die entsprechende Lagerung der Körner und die dünne Verbindungsschicht zwischen den Bazillen wahrnimmt.

Eine Frage, denen Aufklärung sehr wichtig ist, betrifft die Teilung der Granula. In stark entfärbten Präparaten findet man lichtbrechende Körner, *in denen man deutlich eine Teilungsebene sieht, durch welche zwei ungleiche Portionen gebildet werden, welche gefärbte Säume zeigen, was eine Kondensation der chromatischen Substanz beweist*; das Zentrum des Kornes erscheint dann *als ungefärbter Punkt* (Fig. 4, 5). In Folge dieser ungleichen Teilung sieht man in den Klümpchen immer ein Granulum, welches grösser ist, als die übrigen (Fig. 5). Man kann dies so erklären, dass man das Korn als ein Chromidialsystem auffasst, welches schon für die nächste Teilung vorbereitet ist und dabei die Plasmamenge einschliesst, welche zur Vollendung desselben für die Bildung eines neuen Organismus nötig ist. Es ergiebt sich dies durch die in Kulturen und an pathologischen Produkten gemachte Beobachtung, von körnigen Bildungen, die von einer dünnen Substanzschicht umgeben sind, in welcher die Färbereaktionen bereits die Bildung alkoholresistenter Körper nachweist (Fig. 6), die nur als die Produkte einer Zelltätigkeit aufgefasst werden können. Wie Mesnil (1905), mit Rücksicht auf die Schaudinn'sche Arbeit über *Amoeba testacea*, sagt, wäre dies ein morphologisch demjenigen des *Actinosphärium* homologes Chromidium, welches aber physiologisch anderer Natur ist, da es reproduktive und nicht vegetative Funktion besitzt.

Dass die Granula sich, *auch vom Bazillenkörper getrennt*, teilen, scheint mir aus den Figuren 7, 7a und 7b deutlich hervorzugehen. Gibt man dies zu, was mir erwiesen scheint, so repräsentiert das Granulum nicht nur das Reproduktionszentrum des Bazillus, sondern auch die vitale Einheit, d. h. jedes Körnchen stellt ein lebendes Individuum vor. Jede, heute als

saria a ser constituido de tantas unidades vivas quantas granulações reprodutoras possue. Seria uma pequena colonia. E isso é demonstrado pelas preparações de culturas em péle, onde se nota que um unico bacilo (o maior das figuras) se pode reproduzir não só no sentido transverso, (Est. 16, figs. 8 e 9) orijinando grumo, como no sentido lonjitudinal á custa da granulação formada lateralmente (fig. 10). Isso se dá na direção de um dos polos do bacilo (Est. 16, fig. 10) ou obliquamente em relação ás granulações intermedias, criando assim as formas dicotomicas. (Est. 16, fig. 11) ou ramificadas ou novos grumos, quando se dá a fragmentação. O mesmo se observa nas culturas homojeneas com preparados córados pela hematoxilina DELAFIELD (Est. 16, fig. 3).

Esta concepção seria confirmada ainda pelo fato observado e reprezentado pelas figs. 12, 12a, 12b, 12c e 12d, da Est. 16 que, se fossem interpretadas como divizão lonjitudinal do bacilo iriam de encontro a tudo quanto está estabelecido em relação á divizão dos bacterios. Entretanto, o fato não é paradoxal, deriva excluzivamente do emprego do termo *bacilo* em relação á tuberculoze, considerando-o como *unidade viva*. Substituamol-o pelo termo *colonia* e poderemos compreender a *clivajem* dessa colonia pelo mecanismo acima referido. A expresão mais simples da colonia é aquillo que hoje em dia denominamos bacilo. A clivajem desse bacilo reprezentaria não um proceso de divizão delle porém um processo de reprodução da colonia. Trata-se de nova confirmação da majistral concepção de HARTMANN (1909) sobre os nucleos polienerjeticos amplamente demonstrada por este autor entre os protozoarios e que como fato biolojico de ordem geral não podia deixar de ser reprezentada entre os bacterios. Si por acazo essa verificação não pode ser feita morfolojicamente em todos os pontos, deriva excluzivamente do tama-

Bazillus angesehene. Einheit wäre dann aus so vielen Individuen zusammengesetzt, als sie reproduktive Körnchen besitzt, und wäre eine kleine Kolonie. Dies ergiebt sich aus Präparaten von Hautkulturen, wo man sieht, dass ein einzelner Bazillus (der grösste der Figuren) sich nicht nur in transversaler Richtung (Figs. 8, 9) vermehren kann, wodurch sich ein Klümpchen bildet, sondern auch in der Längsrichtung durch eine seitlich gebildete Granulation (Fig 10). Dies geschieht in der Richtung eines der Pole des Bazillus (Fig. 10) oder in schräger Abzweigung in Hinsicht auf die intermediären Granula, wodurch dichotome Formen entstehen (Fig. 11) oder auch neue Klümpchen im Falle eintretender Fragmentation. Dasselbe beobachtet man an der homogenen Kultur in den mit Hämatoxylin nach DELAFIELD gefärbten Präparaten (Fig. 3).

Eine weitere Bestätigung dieser Auffassung wäre noch durch die in Figur 12, 12a, 12b, 12c und 12d wiedergegebene Beobachtung gegeben, welche, als eine Längsteilung gedeutet, allem zuwiderlaufen würde, was bisher über die Teilung der Bakterien festgestellt wurde. Doch ist das Factum an und für sich nicht paradox, sondern nur durch die Anwendung des Ausdrucks *Bazillus* bei der Tuberkulose als Bezeichnung des *einzelnen lebenden Individuums*. Substituiert man ihn durch *Kolonie*, so kann man die *Teilung* derselben durch den geschilderten Mechanismus verstehen. Der einfachste Ausdruck der Kolonie ist dasjenige, was wir heute als Bazillus bezeichnen und die Spaltung desselben würde nicht seine Teilung, sondern einen Reproduktionsprozess der Kolonie bedeuten. Es handelt sich um eine neue Bestätigung der meisterhaften Auffassung von HARTMANN über polyenergetische Kerne, welche von ihm bei Protozoen in weitem Umfange erwiesen wurde, und welche, als biologische Tatsache von allgemeiner Tragweite, auch bei den Bakterien vertreten sein musste. Wenn diese Feststellung zufällig nicht in allen Punkten morphologisch gemacht werden kann, so

nho excessivamente pequeno da granulação que, mesmo sob os mais fortes aumentos (obj. apocrom. 2 mm. e oc. 18 Zeiss) não deixa que se observem figuras de mitoze no seu interior.

A granulação no bacilo da tuberculoze reprezenta pois a mesma função que o conidio dos cogumelos; é o que rezulta da observação das formas analogas ás formas de frutificação daquelles vejetais inferiores, formas que são observaveis na tuberculoze, tanto nas culturas homojeneas, como nos produtos patolojicos. A propria divizão da granulação mostra que ha formação de conidios secundarios (Est. 16, fig. 7a) analogos aos encontrados por Brefeld (1871) na *Empusa muscae*. Isso explica a razão porque a tuberculoze não reziste ás cauzas de destruição á que geralmente rezistem os organismos que possuem os verdadeiros esporios (esporios diferenciados, endosporios). *A granulação sendo verdadeiro conidio* ou *exosporio* explica, porque o virus da tuberculoze reziste pouco ao calor, como sucede e é fato sabido geralmente, com os cogumelos, que por esse modo frutificam.

Não se pense haver confuzão nas referencias sucessivas que fazemos ás expressões sistema cromidial, nucleos polienerjeticos e conidio dos cogumelos. A concepção de Hartmann identifica a função do cromidio generativo á dos nucleos polienerjeticos de modo que estes reprezentam relativamente á reprodução do organismo primitivo precizamente a mesma função que as granulações reprodutoras observadas na tuberculoze.

Trata-se na tubzerculoze *fiziolojicamente* e não *morfolojicamente* (porque não pudemos acompanhar as fazes todas do processo intimo de divizão da granulação) *do mesmo papel reprezentado pelos nucleos polienerjeticos na reprodução dos protozoarios.*

ist dies ausschliesslich eine Folge der geringen Grössen der Granula, die selbst bei den stärksten Vergrösserungen (Apochr. 2mm, Oc. 18 von Zeiss) nicht gestattet, in ihrem Innern Mitosefiguren wahrzunehmen.

Die Granulation entspricht also beim Tuberkelbazillus derselben Funktion, wie sie das Conidium der Pilze ausübt; es geht dies aus der Beobachtung von Formen hervor, welche den Fruktifikationsformen dieser niedern Pflanzen analog sind und bei der Tuberkulose, sowohl in homogenen Kulturen, als auch in pathologischen Produkten, beobachtet werden. Die blosse Teilung der Granula zeigt, dass eine Bildung sekundärer Conidien stattfindet (Fig. 7a), analog denjenigen wie sie Brefeld (1871) bei *Empusa muscae* fand. Dies erklärt uns den Grund, warum die Tuberkulose zerstörenden Einflüssen nicht widersteht, welchen Organismen mit ächten Sporen (differenzierte oder Endosporen) Stand halten. *Das Granulum der Tuberkulose, als ächtes Conidium oder Exospore*, erklärt, warum das Virus der Hitze wenig widersteht, wie dies ja auch bei Pilzen, die sich auf solche Art fortpflanzen, geschieht, was allgemein bekannt ist.

Man denke nicht, dass es sich bei der wiederholten Erwähnung der Ausdrücke Chromidialsystem, polyenergetische Kerne und Pilzconidien um eine Verwechslung handle. Die Auffassung von Hartmann identifizirt die Funktion des generativen Chromidiums mit diesem der polyenergetischen Kernen, so dass diehe in Hinsicht auf die Reproduction des primitiven Organismus dieselbe Funktion erfüllen, wie die der Fortpflanzung dienenden Granula, welche man bei der Tuberkulose beobachtet.

Es handelt sich bei der Tuberkulose um eine physiologische und nicht morphologische Uebereinstimmung mit der Rolle, welche die polyenergetischen Kerne bei der Vermehrung der Protozoen erfüllen da ich die Phasen des Teilungsvorganges nicht in ihren Einzelheiten genauer verfolgen konnte.

Ainda *fiziolojicamente* o papel das granulações reprodutoras na tuberculoze é analogo ao papel dos conidios dos cogumelos: em ambos os cazos se trata do elemento gerador do organismo primitivo; no cazo particular da tuberculoze ellas orijinam granulações menores que se conservam ligadas por delgados filamentos, como se fosse um esboço da organização de micelio dos cogumelos, e mostram ser a forma mais rezistente da vida do parazito da tuberculoze.

A identificação com o micelio dos cogumelos não poude ser feita por não se observar a formação de septos, nem se poder acompanhar o fenomeno intimo da organização da granulação.

O papel, que a granulação exerce em relação ao organismo infetado por tuberculoze é tambem preponderante. Já Much (1907) determinára *in vitro* a transformação da granulação em bacilo e *in vivo* a natureza infetante da *forma granular* no puz tuberculozo; aí porem objetar-se-ia que bacilos inteiros pudessem ser injetados com o material em experiencia. Tornava-se pois necessario obter a granulação separada do resto do material para verificar a sua ação sobre o organismo vivo. Com esse intuito instituimos as seguintes experiencias:

Exp. I. 5 ccm. de puz cazeozo de cobaia infetada com bacilo humano foram diluidos em 20 ccm. de agua fiziolojica e filtrado o produto em vela Berkefeld (modelo Nordmeyer). O produto obtido por filtração foi dividido em duas porções iguais. Uma foi centrifugada e o sedimento obtido mostrou em preparado microscopico corado por Gram e fuchsina diluida a existencia de granulações e de detritos de bacilos não revelaveis pelo Ziehl-acido azotico ao terço.

A outra porção foi inoculada sob a pele de uma cobaia. *Não se formou can-*

Ebenfalls physiologisch stimmt die Rolle der bei der Tuberkulose der Fortpflanzung dienenden Granula mit derjenigen der Conidien bei den Pilzen überein: in beiden Fällen handelt es sich um das Element, welches den ursprünglischen Organismus erzeugt; daselbe bildet bei der Tuberculose kleinere Granula, welche durch zarte Fäden verbunden bleiben, wie wenn es sich um eine Andeutung der Organisation des Pilzmyceliums handelte und erweist sich als die widerstandsfähigste Lebensform des Parasiten der Tuberculose.

Eine Identification mit dem Nycelium der Pilze kann desshalb nicht gemacht werden, weil die Bildung von Septen nicht beobachtet wurde und auch der feinere Organisationsprozess der Granula nicht verfolgt werden konnte.

Die Rolle, welche die Granula dem mit Tuberkulose infizierten Organismus gegenüber spielen, ist ebenfalls von grösster Wichtigkeit. Schon Much (7) (1907) hatte *in vitro* die Verwandlung der Granula in Bazillen und *in vivo* die infektiöse Natur der *granulösen Form* bei der Tuberculose festgestellt; hier konnte man jedoch einwerfen, das möglicherweise mit dem Versuchsmaterial ganze Bazillen injizrt wurden. Es wurde daher nötig, die Granula getrennt von dem übrigen Materiale zu erhalten, um ihre Einwirkung auf den lebenden Organismus festzustellen. Zu diesem Zwecke stellte ich folgende Versuche an:

Erster Versuch: Es werden 5 ccm. käsigen Eiters eines mit Bazillen menschlicher Abkunft infizierten Meerschweinchens in 20 ccm. physiologischer Lösung verteilt und das Produkt auf einem Berkefeld'schen Filter (Modell von Nordmeyer) filtriert. Das Filtrat wurde in zwei gleiche Portionen geteilt; die eine wurde zentrifugiert und das erhaltene Sediment zeigte im mikroskopischen, mit Gram und verdünntem Fuchsin gefärbten, Präparate das Vorkommen von Körnchen und Bazillendetritus, welche durch Ziehl und Salpetersaure (1:2) nicht nachweisbar waren.

cro no ponto de inoculação; o material inoculado tinha-se reabsorvido todo sem reação aparente *quando 15 dias apoz a inoculação começou a esboçar-se sinal de reação ganglionar que se traduzia por aumento de volume e endurecimento dos ganglios inguinais correspondentes ao ponto onde fora praticada a inoculação.* O animal foi sacrificado um mez depois da inoculação e mostrou por autopsia *ganglios inguinais aumentados de volume, duros e hiperemiados.* Preparações por esfregaço mostraram auzencia de bacilos da tuberculoze, e existencia de granulações incluidas em linfócitos. O baço aumentado de volume e conjesto, mostrava em córtes infiltração linfocitaria e hemorrajias intersticiais, *auzencia de bacilos, prezença* de granulações incluidas em celulas embrionarias (Est. 17, fig. 13).

Em ambos os organs não houve formação de puz.

Exp. II. Para verificar se a reação obtida no animal corria por conta da existencia de bacilos uma quarta parte do baço foi injetada, depois de finamente dividida sob a pele de uma cobaia. Oito dias depois formou-se um nodulo duro no ponto da inoculação e um mez depois ainda permanecendo elle e havendo pequeno aumento de volume dos ganglios da rejião foram essas duas lezões retiradas por biópsia. *Examinadas por córtes* em serie não mostraram reação tuberculoza, de anormal nelles só se encontrou pigmento hematico.

Aquellas reações são analogas ás que se produzem na infeção tuberculoza e identicas ás descritas por Auclair e Paris quando estudam a bacilocazeina por elles izolada. Seria pois atribuivel á esta a reação obtida pela inoculação do puz filtrado. No entanto, como o exame microscopico do produto injetado revelasse a prezença de numerozas granulações analogas ás do bacilos e com a mesma reação córante, não

Die andere Portion wurde einem Meerschweinchen unter die Haut gespritzt. *Es bildete sich am Orte der Einimpfung kein chancröses Geschwür* und das Material war ohne sichtbare Reaktion resosbiert worden, *als plötzlich* 15 *Tage nach der Einimpfung eine Drüsenreaktion zu erscheinen begann, welche sich der Injektionstelle entsprechend durch eine Vergrösserung und Verhärtung der Leistendrüsen äusserte.* Das Tier wurde nach einem Monate getötet und zeigte bei der Autopsie *die geschwollenen Leistendrüsen hyperämisch und von harter Konsistenz.* Ausstrichspräparate zeigten das Fehlen von Tuberkelbazillen und das Vorkomen in Lymphocyten eingeschlossener Granula. Die Milz, vergrössert und blutreich, zeigte auf Schnitten eine Infiltration mit Lymphocyten und interstitielle Hämorrhagien, *Fehlen von Bazillen und Vorkommen von in Embryonalzellen eingeschlossenen Granulis* (Mikrophotographie, Fig. 13).

In beiden Organen war kein Eiter gebildet worden.

Zweiter Versuch: Um festzustellen, ob die bei dem Tiere festgestellte Reaktion auf Rechnung des Bazillus kam, wurde ein Viertel der Milz fein zerteilt und einem Meerschweinchen unter die Haut gespritzt. Acht Tage später bildete sich ein hartes Knötchen an der Injektionsstelle, und, da dasselbe nach einem Monate noch weiter bestand und die regionären Lymphdrüsen etwas vergrössert waren, wurden beide Läsionen durch Biopsie entfernt. *In Serienschnitten untersucht,* zeigten sie keine tuberkulöse Reaktion und ausser Blutpigment fand sich nichts abnormes in denselben.

Jene Reaktionen sind denjenigen, welche bei der tuberkulösen Infektion auftreten analog und identisch mit den, von Auclair und Paris (8) beim Studium des von ihnen isolierten Bazillencaseins bes beschriebenen. Es wäre daher gestattet, diesem die durch Injektion filtrierten Eiters erhaltene Reaktion zuzuschreiben. Da indessem die mikroskopische Untersuchung des injizierten Produktes das Vorkommem von

seria descabido pensar exercerem ellas o principio tuberculijeno.

Podia-se ainda objetar serem as granulações encontradas no puz rezultado de alteração celular, granulações proteicas não especificas. Com o fim de elucidar esses pontos, procedi ao estudo da bacilo-cazeina de AUCLAIR, preparando-a sob a tecnica indicada por esses autores, no trabalho já citado. O produto obtido apoz os diferentes tratamentos (dezengorduramento completo; ação de acido acetico puro a 80° C.; ação de alcool a 80° como ajente de lavajem do produto precipitado pela neutralização incompleta do meio; ação de alcool a 95, como clarificador, mostrou-me sempre quando córado pelo GRAM e fuchsina diluida e examinado ao microscopio a existencia de duas substancias: uma que tomava o GRAM — esta era reprezentada por bacilos que ainda conservavam a sua forma e por numerozas granulaões livres — e outra que se corava facilmente pela fucsina diluida.

Era pois a bacilo-cazeina de AUCLAIR e PARIS um produto complexo e a reação por aquelles autores descrita poderia correr por conta tanto do produto que tomava o GRAM como do que se córava pela fucsina. Impunha-se, pois, obter a separação dessas duas substancias para que se pudesse formar juizo definitivo sobre sua ação patojenica.

Pelas reações córantes mostravam-se essas duas substancias de natureza diversa, uma das quais de função puramente acida — a das granulações. Entretanto, quer a acidulação do meio, quer a sua alcalinização cuidadoza não nos poude fornecer nenhuma dessas substancias izolada.

Outro caminho seria obter a separação dellas por meio de filtro. Para isso tratámos a bacilo-cazeina que tinhamos preparado com uma solução de fosfato neutro de sodio. A dissolução não foi com-

Granulis nachweist, welche denjenigen der Brazillen ähnlich sind und dieselbe Färb-ereaktion zengen, scheint die Auffassung gestattet, dass sie das tuberkelerzeugende Prinzip darstellen.

Man könnte noch einwenden, dass die im Eiter gefundenen Granula Folge einer Alteration der Zellen und eiweissartige Körnchen ohne spezifische Reaktion seien. Um diesen Punkt aufzuklären, machte ich mich an das Studiums des Bazillocaseins von AUCLAIR, indem ich es nach der, von den Autoren in der oben erwähnten Arbeit angegebenen, Technik darstellte. Das Produkt der verschiedenen Manipulationen (vollständige Entfettung, Einwirkung reiner Essigsäure bei 80 Grad, Waschen des durch unvollständige Neutralisation gefällten Produktes mit 80° Alkohol, Reinigung mit 95° Alkohol) zeigte, nach Fuchsin-nach GRAM und mit verdünnter Fuchsinlösung, unter dem Mikroskope das Vorkommen zweier Substanzen: eine, die sich nach GRAM färbte und aus gut erhaltenen Bazillen und zahlreichen freien Körnern bestand und eine, die sich leicht mit verdünnter Fuchsinlösung färbte.

Das Bacillocasein von AUCLAIR und PARIS war also ein zusammengesetztes Produkt und die von den Autoren beschriebene Reaktion konnte ebensogut auf Rechnung des GRAM-positiven Produktes, als auf diejenige des fuchsingefärbten kommen. Es erschien also die Trennumg dieser beiden Substanzen geboten, um ein definitives Urteil über ihre pathogene Wirkung zu gewinnen.

Bei der Färbung zeigte sich die verschiedene Natur dieser beiden Substanzen, von denen eine, die der Granula, als Säure funktionierte. Doch konnte mir weder die Ansäuerung des Mediums, noch seine sorgfätige Alkalinisierung eine der Substanzen isoliert ergeben.

Eine andere Möglichkeit wäre, dieselben durch Filtrieren zu trennen. Zu diesem Zwecke behandelte ich das von mir isolierte Bacillocasein mit einer Lösung von neutralem Natriumphosphat. Die Lösung war keine vollständige; in der Ruhe bil-

pleta, deixada em repouzo forneceu um sedimento que examinado ao microscopio em preparações córadas pelo GRAM — fuchsina diluida mostrou numerozos bacilos em cuja maioria não se viam mais granulações e que tomaram facilmente a fucsina diluida (Est. 16, Figs. 14 e 15).

Decantado o liquido foi elle filtrado em véla CHAMBERLAND. Ainda neste produto não conseguimos obter precipitação quer pela acidulação quer pela alcalinização. Pelo exame do sedimento apóz centrifugação nada pudemos concluir de pozitivo.

Recorremos então a ultra-filtração em véla PUKAL induzida de colodio. Apoz filtração a camada de colodio foi dissolvida em eter. As preparações feitas com esse material, córadas pelo GRAM, nos mostravam a existencia de granulações incluidas em substancia que se córava facilmente pela fuchsina diluida. A centrifugação ainda nenhum rezultado pozitivo nos poude fornecer.

No entanto, uzando de um processo, indireto, se não pudemos provar de modo irrecuzavel a natureza quimica da granulação, os rezultados que obtivemos indicam e aduzem argumentos em favor da idea de ser ella constituida pela bacilo-cazeina.

Fazendo uma emulsão de bacilos de tuberculoze dezengordurados em uma solução de bicarbonato de calcio obtivemos, apoz permanencia na estufa a 38.º C., por 48 horas ou apoz ebulição da emulsão, um produto liquido que, filtrado e deixado evaporar sobre vidro de relojio forneceu cristais de fosfato bicalcico de mistura com carbonato pulverulento. Se adicionavamos a esse liquido sulfato de magnezio, amonia e cloridrato de amoniaco, obtinhamos o fosfato cristalizado sob a forma de fosfato amoniaco magneziano. Esse mesmo rezultado obtivemos com uma solução de sacarato de calcio acidulada pelo acido citrico.

Em concordancia com esse fato constatava-se o dezaparecimento de grande numero de granulações e as preparações

dete sich wieder ein Bodensatz, der in, wie oben gefärbten, mikroskopischen Präparaten zahlreiche Bazillen zeigte, welche grösstenteils keine Körner mehr enthielten und die verdünnte Fuchsinlösung leicht aufnahmen (Fig. 14, 15).

Nach der Dekantierung wurde die Flüssigkeit durch eine CHAMBERLAND'sche Kerze filtriert. Auch jetzt konnten wir weder durch Ansäuerung, noch durch Alkalinisierung, ein Präcipitat erhalten. Die Untersuchung des Sedimentes nach dem Zentrifugieren ergab nichts positives.

Ich versuchte dann die Ultrafiltrierung mittelst eines mit Collodium überzogenen PUKAL-Filters ; nach der Filtration wurde die Kollodiumschicht in Aether aufgelöst. Mit diesem Material gemachte und nach GRAM gefärbte Präparate zeigten das Vorkommen von Granulis in einer Substanz, welche sich leicht mit verdünnter Fuchsinlösung färbte. Die Zentrifugirung konnte mir auch hier kein positives Resultat geben.

Gelang es mir auch nicht, die chemische Zusammensetzung der Granula in unwiderleglicher Weise zu zeigen, so erhielt ich immerhin durch Anwendung eines indirecten Prozesses Resultate, welche darauf hinweisen und zu Gunsten davon sprechen, dass sie aus Bazillocasein bestehen.

Machte ich von entfetteten Tuberkelbazillen eine Emulsion ei einer Lösung von Kalciumbikarbonat, so erhielt ich, nach 48stündigem Verweilen im Brütschrank von 38° oder nach Kochen der Lösung, ein flüssiges Produkt, welches nach Filtration und Verdunstung im Uhrglase basisch phosphorsauren Kalk, mit einem pulverförmigen Karbonate gemischt, hinterliess. Setzte ich der Flüssigkeit Magnesiumsulfat, Ammoniak und Salmiak zu, so erhielt ich krystallisiertes Phosphat in der Form von phosphorsaurer Ammomakmagnesia. Dasselbe Resultat erhielt ich mit einer Lösung von Zuckerkalk, die mit Zitronensäure angesäuert war.

In Uebereinstimmung mit dieser Tatsache konstatierte ich das Verchwinden einer grossen Zahl von Körnern und die

mostravam a maioria dos bacilos facilmente coraveis pela fucsina diluida, em cujo corpo notavam-se manchas claras semelhando pequenos vacuolos (Est. 16, fig. 16). Essas preparações e as reações obtidas *in vitro* com os sais soluveis de calcio indicam claramente que a granulação do bacilo de tuberculoze se comportava aí como a cazeina de leite em meio acido. As granulações são pois constituidas, se não em sua totalidade pelo menos na sua maior massa por uma *para-nucleo-albumina* analoga ou provavelmente identica á bacilo-cazeina. O dezaparecimento das granulações e a reação obtida com os sais soluveis de calcio acima referida talvez possam explicar a calcificação dos tuberculos como processo natural de cura na infeção tuberculoza.

A cobaia, que servira para a exp. II, conservou-se com saude aparente durante cinco mezes, prazo, durante o qual ella permaneceu em observação. Ao cabo desse tempo foi sacrificada. A autopsia não mostrou alteração macroscopica dos organs a não ser diminutos fócos hiperemiados na baze do pulmão e pequeno aumento no volume do baço. Ganglios normaes e não conjestos.

Foram retirados fragmentos dos ganglios, baço e pulmões para exame microscopico.

Os córtes dos ganglios e pulmões mostraram bacilos da tuberculoze em numero muito pequeno porém caraterizaveis pela hematoxilina e Ziehl acido azotico ao terço; ZIEHL-GRAM (alcool-acetona ao terço) (Est. 16, figs. 17 e 18).

Não se observou reação tuberculoza constituida nitidamente. Esta sómente se traduzia por grande infiltração linfocitaria.

Os rezultados obtidos pela inoculação dessa cobaia permittem algumas considerações que nos parecem da maior monta para o tão debatido assunto de tuberculoze latente. Em verdade não se poderá explicar de outro modo a permanencia no organismo da cobaia de elementos vivos (gra-

Präparate zeigten die Mehrzahl der Bazillen mit verdünnter Fuchsinlösung leicht färbbar und in ihrem Innern helle Flecken, die wie kleine Vakuolen ussahen (Fig. 16). Diese Präparate und die, *in vitro* mit löslichen Kalksalzen erhaltenen, Reaktionen weisen deutlich darauf hin, dass sich die Granula des Tuberkelbazillus dabei wie das Casein der Milch in Gegenwart von Säuren verhielten. Die Granula bestehen also, wenn nicht ganz, so doch zum grössten Teile, aus einem *Paranucleoalbumin*, welches dem Bacillocasein analog und wahrscheinlich mit demselben identisch ist. Das Verschwinden der Granula und die erhaltene Reaktion können uns die Verkalkung der Tuberkel als einen natürlichen Heilungsprozess der tuberkulösen Infektion erklären.

Das Meerschweinchen, welches zum zweiten Versuche gedient hatte, wurde während fünf Monaten beobachtet und blieb während dieser Zeit anscheinend gesund. Es wurde dann getötet und die Autopsie ergab in den Organen keine makroskopischen Veränderungen ausser unbedeutenden hyperämischen Heerden der Lungenbasis und einer geringen Grössenzunahme der Milz. Die Leistendrüsen waren normal und nicht hyperämisch.

Von Lymphdrüsen, Milz und Lungen wurden Fragmente für die mikroskopische Untersuchung entnommen.

Die Lymphdrüsen- und Lungenschnitte zeigten Tuberkelbazillen in sehr geringer Zahl, welche aber durch Hämatoxylin, Ziehl und Salpetersäure (1 :2), sowie Ziehl-Gram und Alkohol-Aceton (1 :2) leicht darstellbar waren (Fig. 17, 18).

Eine gut gekenntzeichnete tuberkulöse Reaktion wurde nicht gefunden; dieselbe äusserte sich nur durch eine starke Leukozyteninfiltration. Die, durch die Impfung bei diesem Meerchweinchen erhaltenen, Resultate geben Anlass zu einigen Betrachtungen, die mir für die vielbesprochene Frage der latenten Tuberkulose von grösster Wichtigkeit scheinen. In der Tat liess sich das Fortbestehen lebender Elemente (Granula), die in Serien aus-

nulações) que por serie forneçam bacilos constituidos, revelaveis pelos metodos de coloração especifica.

Durante cinco mezes o animal não reajiu por nenhum sinal macroscopico. Não houve constituição de cancro no ponto de inoculação, não houve formação de puz no interior dos ganglios, o volume destes era normal. *Nada indicava haver bacilos no interior dos ganglios nem dos orgãos internos;* a falta de reação era tão clara *que não prezumiamos tratar-se de animal infetado com tuberculoze.* Entretanto, o exame dos córtes mostrou, *que nessa cobaia, que viveu durante cinco mezes sem sinal de molestia, sem reação alguma que fizesse prezumir tuberculoze e sendo sacrificada não mostrou lezão mais notavel que a infiltração linofocitaria, havia granulações e bacilos constituidos.*

Tratando-se de um animal sensivel á tuberculoze como a cobaia esses fatos nos indicam que devem ser elles aplicados tambem aos homens, onde os cazos de tuberculoze latente são previstos pela razão e onde, se forem confirmados experimentalmente, como conseguimos verifical-os na cobaia, poderá ser substituida senão inteiramente, pelo menos em grande parte dos cazos a noção de *terreno tuberculizavel* pela *de terreno com tuberculoze em potencial.*

CONCLUZÕES.

1.° As granulações do bacilo da tuberculoze são constituidas por substancia de natureza cromatica.

2.° O bacilo da tuberculoze deve ser considerado como uma reunião de unidades vivas que são reprezentadas pelas granulações reprodutoras.

gebildete, durch spezifische Färbereaktion nachweisbare Bazillen liefern, nicht anders erklären.

Während fünf Monaten reagierte das Tier durch kein makroskopisches Symptom. Es bildete sich an der Impfstelle kein chancröses Geschwür und kein Eiter in den Lymphdrüsen, deren Volumen normal war. *Nichts wies darauf hin, dass Bazillen im Innern der Lymphdrüsen und der innern Organe existierten*; das Fehlen einer Reaktion war so deutlich, *dass ich nicht glaubte, dass es sich um ein tuberkulöses Tier handle.* Dennoch zeigte die Untersuchung von Schnitten, *dass bei diesem Meerschweinchen, welches fünf Monate ohne Krankheitserscheinungen, ohne eine Reaktion, die auf Tuberkulose deutete, lebte, und getötet keine wichtigere Veränderung, als eine Rundzelleninfiltration aufwies, Granula und ausgebildete Bazillen vorhanden waren.*

Da es sich um ein Meerschweinchen, also um ein für Tuberkulode empfängliches Tier, handelte, ist es angebracht, diese Tatsachen auch auf den Menschen anzuwenden, wo Fälle latenter Tuberkulose aus Vernunftgründen angenommen werden müssen; sollten sie bei diesem experimentell erwiesen werden, wie ich sie beim Meerschweinchen feststellen konnte, so wird man, wenn nicht in allen Fällen, so doch in einem grossen Teile derselben, den Begriff des *tuberkulisierbaren Terrains* durch denjenigen eines mit *latenter Tuberkulose infizierten Terrains ersetzen können.*

SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Die Granula des Tuberkelbazillus sind von einer chromatinartigen Substanz gebildet.

2. Der Tuberkelbazillus muss als eine Vereinigung lebender Einheiten angesehen werden, welche durch die reproduktionsfähigen Granula repräsentiert werden.

3.° As granulações reprodutoras reprezentam na tuberculoze a mesma função que os conidios dos cogumelos.

4.° As granulações existentes no puz tuberculozo atravessam os filtros Berkefeld (Modelo Nordmeyer).

5.° As granulações determinam na cobaia o inicio da reação tuberculijena.

6.° As granulações são constituidas, senão em totalidade, pelo menos em sua maior parte, por uma *paranucleo albumina*, analoga ou provavelmente identica a bacilo-cazeina de Auclair e Paris.

7.° As granulações injetadas em cobaias produzem bacilos revelaveis por inoculação em serie.

8.° Nas culturas o virus da tuberculoze evolve desde o estádio de granulação ao de grumos bacilares.

9.° O animal experimentado não revelou molestia durante cinco mezes; nelle foram encontrados bacilos de tuberculoze sem lezões especificas maiores que infiltração linfocitaria

Agradecemos aos bons amigos e companheiros de trabalho Drs. Carlos Chagas, Gaspar Vianna e A. Machado o auxilio que nos prestaram e que nos foi sobremodo eficaz não só no estudo da citolojia do bacilo como no das lezões experimentais.

Já estava escrito e em provas o prezente trabalho quando tivemos conhecimento pelo Dr. Adolpho Lutz de uma publicação que fizera em 1886 e que saiu inserta no primeiro faciculo dos «Dermatologische Studien, hrsg. v. Dr. P. G. Unna soib o titulo «Zur Morphologie des Mikroorganismus der Lepra». Por esse trabalho se vê que já o Dr. Lutz havia verificado o papel preponderante da gra-

3. Die reproduktionsfähigen Granula dienen bei der Tuberkulose derselben Funktion, wie die Conidien bei den Pilzen.

4. Die im tuberkulösen Eiter enthaltenen Granula gehen durch Berkefeld'sche Filter (Modell von Nordmeyer) hindurch.

5. Die Granula bewirken bei Meerchweinchen den Beginn der tuberkelbildenden Reaktion.

6. Die Granula bestehen, wenn nicht ganz, so doch zum grössten Teile, aus einem Paranucleoalbumin, das dem Bacillocasein von Auclair und Paris analog und wahrscheinlich mit demselben identisch ist.

7. In Meerschwinchen injizirt, bringen die Granula Bazillen hervor, welche durch Uebeberimpfung in Serien nachweisbar sind.

8. In den Kulturen entwickelt sich das Tuberkulosevirus vom Stadium des Granulums zu demjenigen der Bazillenklümpchen.

9. Das Versuchstier zeigte während neun Monaten keine Krankheit; es wurden in demselben Tuberkelbazillen gefunden, ohne grössere spezifische Veränderungen, als eine Leukozyteninfiltration.

Meinen Freunden und Mitarbeitern Drs. Carlos Chagas, Gaspar Vianna und A. Machado verdanke ich die mir geleistete Hilfe, welche mir besonders beim Studium der Zytologie des Bazillus und der experimentell erzeugten Veränderungen von Nutzen war.

Diese Arbeit war bereits druckfertig als ich von Dr. Adolph Lutz von einer, von ihm im Jahre 1886 gemachten Publication, mitteilung erhlielt; dieselbe erschien im ersten der von Dr. P. G. Unna herausgegebenen Hefte «Dermatologische Studien» unter dem Titel «Zur Morphologie des Microorganismus der Lepra». Man sieht daraus, das Dr. Lutz bereits die vorwiegende Rolle der Granulationen des Leprabazillus bei seiner Reproduktion fest-

nulação do bacilo da lepra na reprodução dele. Mostra a verificação feita por mim na tuberculoze 24 anos depois do que LUTZ descreveu em relação á lepra (e tuberculoze) ainda que com interpretação diversa do processo de reprodução, a justeza de nossas observações. E isso será tanto mais digno de nota quanto se pensar na dificuldade da tecnica do inicio da bacteriolojia, *maxime* em verificações desta natureza.

Manguinhos, Março — 1910.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS
16 e 17.

Fig. 1. Preparação de cultura homojenea antiga. Fixação a humido pelo sublimado-alcool; coloração pelo metodo FONTES.

Fig. 2 & 2*a*. Preparações de culturas homojeneas, fixadas a humido e coradas pela hematoxilina DELAFIELD.

Fig. 3. Preparação de cultura homojenea, fixada a humido; coloração pela hematoxilina DELAFIELD.

Fig. 3*a*. Preparação de escarro tuberculozo, fixado a humido e corado pelo metodo FONTES.

Fig. 4 & 5. Preparações de culturas homojeneas. — Fixação a humido e coloração pela hematoxilina DELAFIELD.

Fig. 6. Escarro tuberculozo fixado a humido e corado pelo metodo FONTES.

Fig. 7, 7*a* e 7*b*. Preparações de culturas homojeneas. — Fixação a humido. — Coloração pela hematoxilina DELAFIELD.

Fig. 8. Fragmento de cultura em pele. — Fixação a humido; coloração pelo metodo FONTES.

Fig. 9. Preparação de cultura homogenea. Fixação a humido. — Coloração pela hematoxilina DELAFIELD.

Fig. 10 e 11. Fragmentos de cultura em pele. — Fixação a humido; coloração pelo metodo FONTES.

Fig. 12, 12*a* e 12*b*. Preparação de puz cazeozo de cobaia. — Fixação a humido. — Coloração pela hematoxilina DELAFIELD.

gestellt hatte. Die von mir bei der Tuberkulose gemachte Konstatierung desjenigen, was LUTZ vor 24 Jahren für die Lepra und Tuberculose beschrieb (wenn auch mit einer anderen Auffassung des Reproduktionsprozesses), spricht für die Richtigkeit unserer Beobachtungen. Es ist dies um so merkwürdiger, wenn man die technischen Schwierigkeiten zu Anfang der Bakteriologie in Rechnung zieht, besonders bei Feststellungen dieser Art.

Manguinhos, März — 1910.

ERKLAERUNG DER TAFELN
16 u. 17.

Fig. 1. Präparat von älterer homogener Kultur. Feuchte Fixierung mit Sublimat-Alkohol; Färbung nach FONTES.

Fig. 2. & 2*a*. Präparat von homogener Kultur, feucht fixiert und mit Hämatoxylin nach DELAFIELD gefärbt.

Fig. 3. Ebenso.

Fig. 3*a*. Präparat aus tuberculösem Sputum; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.

Fig. 4—5. Präparate von homogener Kultur; feucht fixiert und nach DELAFIELD mit Hämatoxylin gefärbt.

Fig. 6. Präparat aus tuberkulösen Sputum; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.

Fig. 7, 7*a*, 7*b*. Präparate von homogener Kultur. Feuchte Fixierung und Färbung nach DELAFIELD.

Fig. 8. Fragment aus der in einer Kultur gebildeten Haut; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.

Fig. 9. Präparat von homogener Kultur; feuchte Fixierung und Färbung nach DELAFIELD.

Fig. 10—11. Fragmente aus Hautkulturen; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.

Fig. 12, 12*a*, 12*b*. Präparat aus dem käsigen Eiter eines Meerschweinchens. Feuchte Fixierung und Färbung nach DELAFIELD.

Fig. 12*c*. e 12*d*. Escarro tuberculozo. — Fixação a humido. — Coloração pelo metodo FONTES.

Fig. 13. Corte de baço. — Metodo FONTES. — Fotomicrografia.

Fig. 14. Bacilo-cazeina antes da ação do fosfato de sodio. — GRAM-FUCSINA diluida.

Fig. 15. Bacilo-cazeina depois da ação do fosfato neutro de sodio. — GRAM-FUCSINA diluida.

Fig. 16. Bacilos de tuberculoze corados pelo GRAM-FUCSINA diluida.

Fig. 17. Corte de ganglio — ZIEHL acido azotico ao terço e hematoxilina.

Fig. 18. Corte de pulmão. — Methodo FONTES.

Fig. 12*c*. & 12*d*. Tuberkulöses Sputum; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.

Fig. 13. Milzschnitt nach FONTES gefärbt. Photomikrographie.

Fig. 14. Bazillocasein vor der Einwirkung des basisch phosphorsauren Natrons. GRAM, verdünnte Fuchsinlösung.

Fig. 15. Bazillocasein nach der Einwirkung des basisch phosphorsauren Natrons. GRAM, verdünnte Fuchsinlösung.

Fig. 16. Tuberkelbazillen nach GRAM und mit verdünnter Fuchsinlösung gefärbt.

Fig. 17. Lymphdrüsenschnitt. ZIEHL, Salpetersäure 1 :2 und Hämatoxylin.

Fig. 18. Lungenschnitt. Färbung nach FONTES.

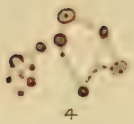
1

2

2 a

3

3 a


4

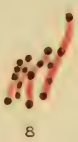
5

6

7

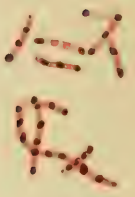
7 a

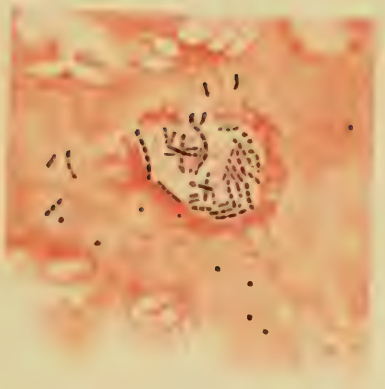
7 b

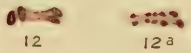

8

9

10


11


14

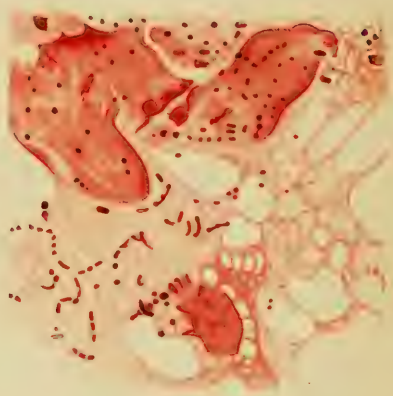

12

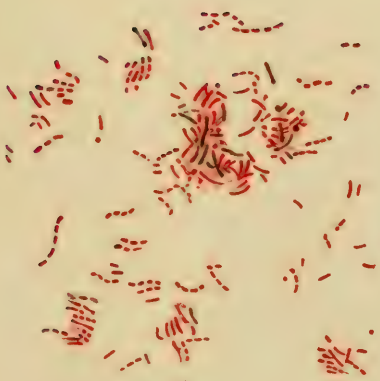
12 a

12 b

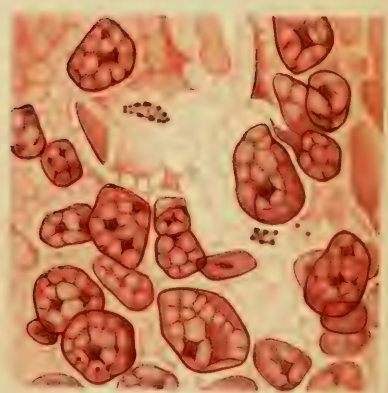
12 c

12 d


15


16

18


17

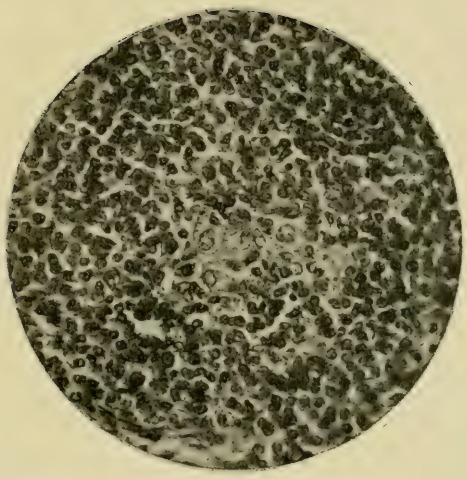


Fig. 13

BIBLIOGRAFIA.

AUCLAIR, JULES & PARIS, LOUIS ..... 1908 Les poisons du bacille tuberculeux humain (5.° mémoire). Constitution chimique et propriétés biologiques du Protoplasma du bacille de la tuberculose.
Archives de méd. exper. et d'anatomie pathologique, Année 20, No. 6.

BERGEL ..... 1909 Fettspaltendes Ferment in den Lymphoziten.
Münch. Mediz. Wochenschr. Jahrg. 56. N. 2.

BREFELD ..... 1871 Entwickelung der Empusa muscae und Empusa radicans.
Abhandl. d. naturf. Ges. Halle. Bd. XII. 1871 apud ZOPF. Die Pilze 1890. Pg. 81 a 82.

FIESSINGER, NOEL & MARIE, PIERRE ..... 1909 La lipase des leucocytes dans les exsudats.
Comptes rendus de la Soc. de Biologie. Tome LXVIII. No. 26.

FONTES, A. ..... 1908 Sobre a existencia nos ganglios tuberculosos de uma substancia capaz de destruir os bacillos da tuberculose. (Nota preliminar).
Brazil-Medico. Anno XXII. No. 40.

FONTES, A. ..... 1908 Diagnostico microscopico differencial entre os bacillos da tuberculose e os outros acido-resistentes.
Brazil-Medico. Anno XXII. No. 41.

FONTES, A. ..... 1909 Ueber eine in den tuberkulösen Lymphdrüsen vorhandene, Tuberkelbacillen tötende Substanz
Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Originale. Bd. L. Heft I. P. 78.

FONTES, A. ..... 1909 Untersuchungen über die chemische Natur der den Tuberkelbacillen eigenen Fett und Wachsarten und über das Phänomen der Säureresistenz.
Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XLIX. Heft 3.

FONTES, A. ..... 1909 Estudos sobre tuberculoze.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Tomo I. Faciculo I.

GIEMSA ..... 1909 Ueber die Färbung von Feuchtpräparaten mit meiner Azur-eosin-methode.
Deuts. Med. Wochenschr. No 40.

HARTMANN, MAX ..... 1909 Polyenergide Kerne.
Sonderabdruck aus dem « Biologischen Centralblatt ». Bd. XXIX. N. 16 und audgegeben am 1 und 15 August.

MAC LEOD, DR. J. M. A. ..... 1909 An Adress on the present state of our knowledge of the etc., etc.
The Lancet. August 21. Pg. 515.

MESNIL ..... 1905 Chromidies et Questions connexes.
Bulletin de l'Institut Pasteur, Tome III, P. 317.

MUCH ..... 1907 Ueber die granuläre, nach ZIEHL nicht färberische etc.
(Beitr. z. Klin. der Tuberk.) apud BERGER — Vergleichende färberische Nachprüfung verschied. Färbenmethoden — Centralbl. f. Bakt. etc. I Abt. Originale. Bd. 53. Heft 2. Pg. 179.

Informaçõis sobre a biolojia do Conorhinus megistus Burm. (*)

PELO

Dr. Arthur Neiva,

Assistente.

Beitraege zur Biologie des Conorhinus megistus Burm. (*)

VON

Dr. Arthur Neiva,

Assistenten am Institute.

O interesse que o *Conorrhinus megistus* oferece para a medicina data do descobrimento de CHAGAS que demonstrou ser elle o transmissor de uma tripanozomidiaze humana, produzida pelo *Schizotrypanum cruzi* CHAGAS. Este hemiptero é conhecido em algumas zonas do Brazil (Minas, São Paulo, Mato-Grosso), pelo nome vulgar de *barbeiro* e em outras (Mato-Grosso—Sul— e em algumas localidades de S. Paulo) pela dezignação de *chupança* ou mais raramente de *chupão*, nome pelo qual é conhecido em Goiaz; no Rio Grande do Sul, segundo nos afirmaram, é o *Conorhinus*

(*) Diagnoze de BURMEISTER:

« *Cimex megistus; fusco niger, pronoto antice spinis sex obtusis, postice lineolis quatuor, elytrorum venis, abdominisque segmentis margine sanguineis. Long.* 17".

Aus Brasilien; die grosse mir bekannte Art ganz schwarz, die Hinterleibsringe nur auf der Rueckenseite, besonders an den Seiten neben den Flügeldecken blutrot gerandet ».

Esta especie é colocada por LETHIERRY ET SEVERIN no genero *Lamus*. Vid. p. 115 T. III. 1896, do *Catalogue Général des Hemiptères-Hétéroptères.*

Cinjimo-nos, porem, á diagnoze dada por AMYOT para o genero *Conorhinus* e aí colocamos a especie. (Vid. AMYOT p. 383. Hemiptères. 1843).

Das Interesse, welches die Medizin dem *Conorhinus megistus* zuwendet, datiert von der Entdeckung von CHAGAS, dass er der Ueberträger einer menschlichen Trypanosomidiasis ist, welche durch das *Schizotrypanum cruzi* CHAGAS verursacht wird. Diese Wanze ist in einigen Teilen von Brasilien (MINAS, S. PAULO, und MATTO-GROSSO) unter dem Namen *Barbeiro* (Barbier) bekannt, in anderen (Süden von Matto-Grosso und einigen Gegenden von São Paulo) als *chupança* oder seltener als *chupão*, welche letzterer Name auch in Goyaz gebräuchlich ist; in Rio Grande do Sul wird der Conorhinus, wie mir ver-

(*) Diagnose von BURMEISTER:

« Cimex megistus; fusconiger, pronoto antice spinis sex obtusis, postice lineolis quatuor, elytrorum venis, abdominisque segmentis margine sanguineis. Long. 17".

Aus Brasilien; die grosse, mir bekannte Art ganz schwarz, die Hinterleibsringe nur auf der Rückenseite, besonders an den Seiten neben den Flügeldecken blutrot gerandet ».

LETHIERRY und SEVERIN stellen diese Art in das Genus Lamus. (V. T. III, 1896, pg. 115 des Catalogue Général des Hemiptères-Hétéroptères).

Ich folge jedoch der Diagnose von AMYOT für das Genus *Conorhinus* und stelle die Species hierher. (V. AMYOT, Hemiptères. 1843, pg. 383).

denominado vulgarmente *fincão* e em alguns estados do Norte *bicho de parede.*

A area de disseminação parece cobrir todo o paiz, possuindo o Instituto exemplares provindos dos confins da Guiana Ingleza, de Minas, S. Paulo, Mato-Grosso e Goiaz e tendo ainda informações, que lhe denunciam a prezença nos estados de Sergipe, Piauí e Pernambuco.

Atualmente é um inseto domiciliario, sendo provavel que este fato, constitua adaptação relativamente recente porquanto, quando se colocam exemplares em gaiolas contendo folhas verdes, se dezovam, o fazem aglutinando os ovos sobre as folhas, como é de regra, para os reprezentantes da familia. Devido aos novos habitos, que os obrigam a viver entre as frestas das cazas entaipadas, tal já não acontece, sendo as posturas feitas parceladamente e a granel.

Os *barbeiros* começam a sugar 3 a 5 dias depois de nacidos; as refeições fazem-se quazi sempre á noite e ás escuras, no entanto, podem alimentar-se durante o dia, como tivemos a oportunidade de observar em um *barbeiro* criado que sugava tranquilamente um cão que dormia, sem que fosse presentido; fato explicavel, por ser a picada quazi indolor, como experimentalmente verificámos sobre nós mesmo, alimentando larvas; além de que, as informações colhidas em cazas infestadas, depoem unanimes neste sentido. Apenas ás vezes, conseguem despertar o individuo sobre quem sugam, quando este ainda se não encontra em pleno sono, acontecendo surprender o inseto sobre o rosto, parte que parece ser a preferida pela hematofago.

As larvas e as ninfas conhecidas vulgarmente por *cascudos* atacam os leitos em contiguidade com as paredes; os adultos, porem, porque voam, agridem até aos que dormem em redes.

sichert wurde, gewöhnlich als *fincão* und in einigen nördlichen Staaten als *bicho de parede* (Mauer- oder Wandtier) bezeichnet.

Das Verbreitungsgebiet scheint das ganze Land zu umfassen, da das Institut einerseits Exemplare von der Grenze von Britisch Guyana, von Minas, S. Paulo, Matto-Grosso und Goyaz und andererseits Mitteilungen über dessen Vorkommen in den Staaten Sergipe, Piauhy und Pernambuco besitzt.

Gegenwärtig ist das Insekt ein Hausbewohner, doch stellt diese Lebensweise wohl eine relativ neue Anpassung dar, da Exemplare, welche man in Käfigen hält, welche grüne Blätter enthalten, bei der Ablage der Eier diese auf die Blätter kleben, wie es bei anderen Vertretern der Familie die Regel ist. Bei der neuerworbenen Gewohnheit in den Ritzen der Lehmhäuser zu leben, geschieht dies nicht, sondern die Eierablage findet in Parzellen oder *en bloc* statt.

Die Wanzen beginnen das Blutsaugen 3—5 Tage nach dem Verlassen der Eier; sie praktizieren es gewöhnlich in der Nacht und im Dunkeln, doch gelegentlich auch bei Tage, wie ich bei einem erwachsenen Exemplare beobachtete, welches bei Tage ruhig an einem schlafenden Hunde saugte, ohne von diesem bemerkt zu werden. Es erklärt sich dies aus der sehr geringen Schmerzhaftigkeit, welche ich auch experimentell feststellte, indem ich Larven an mir saugen liess; auch die in infizierten Häusern gemachten Erhebungen sprechen einstimmig dafür, dass die angefallenen Individuen nur zuweilen aufwachen, wenn der Schlaf nicht tief ist, wobei sie dann die Wanze auf ihrem Gesichte überraschen, da sie diese Region beim Blutsaugen bevorzugt.

Larven und Nymphen, gewöhnlich *cascudos* genannt (der Name beruht wohl auf Verwechslung mit Käfern, die ihrer harten Schalen wegen so genannt werden), invadieren die Betten, welche die Wände berühren, während die erwachsenen Wanzen, welche fliegen können, auch in Hängematten schlafende Menschen angreifen.

Em Itapura (S. Paulo) localidade imensamente infestada por 2 especies do *Conorhinus*, debalde procurámos fóra dos domicilios a prezença do *barbeiro*, aliaz assignalada pelos habitantes observadores em geral de pouca valia, porquanto, a maioria embora conhecendo o adulto do *barbeiro* supõe tratar-se de outro inseto muito diverso dos *cascudos*.

Das nossas investigações e indagações, verificámos tratar-se de outras especies e de genero diferente da de que ora nos ocupamos.

Os fatos que se vão seguir, foram observados no laboratorio, onde conseguimos criar de ovo á imajem *barbeiros* ali mentados durante o dia em cobaias.

Posturas: Fazem-se parceladamente constando de 1 a 45 ovos; geralmente a postura varia de 8 a 12 ovos, exercendo o hematofajismo incontestavel influencia, dando-se a postura 5 dias na media apoz cada refeição; este fato é melhor observado nas ♀♀ que ainda não copularam mas, que apezar disto, dezovam. As primeiras posturas, sejam ou não de ovos fecundos, são sempre as maiores, ocilando entre 15 a 25 ovos; as ultimas são reprezentadas por 2 — 4 ovos. Uma ♀ observada de 5 de Março a 31 de Julho, quando morreu, efetuou 38 posturas com um total de 218 ovos; releva notar que, este exemplar foi capturado adulto, sendo, portanto, provavel que já tivesse efetuado posturas.

Ovos de 1 — 10 dias são de côr branco-crême; de 12 a 20 dias adquirem colorido rozeo que se vai acentuando até ficar vermelho, ao cabo de 30 dias.

O dezalagamento muito depende da temperatura, dando-se de 25 a 30 dias nos mezes quentes e de 30 a 40 nos mezes frios.

In Itapura im Staate S. Paulo, einer von zwei *Conorhinusarten* sehr stark invadierten Gegend, suchte ich umsonst das angebliche Vorkommen derselben ausserhalb der Wohnungen zu konstatieren; die Einwohner, von denen die Angabe stammt, sind übrigens wenig zuverlässige Beobachter, da die meisten, trotz ihrer Bekannntschaft mit dem erwachsenen *Conorhinus*, denselben für ein anderes, von Larven und Nymphen ganz verschiedenes Insekt hielten. Bei meinen Nachforschungen konstatierte ich, dass es sich um verschiedene, zu anderen Gattungen gehörige, Arten handelte.

Nachstehende Beobachtungen wurden im Laboratorium gemacht, wo die Züchtung des *Conorhinus* vom Ei bis zur Imago gelang, indem man sie bei Tage an Meerschweinchen saugen liess.

Eiablage. — Die Eier werden in Parzellen von 1—45 Stück abgelegt; gewöhnlich sind es 8—12; doch übt die Blutaufnahme einen unzweifelhaften Einfluss auf die Ablage der Eier aus, welche im Mittel fünf Tage nach derselben stattfindet; diese Verhältnisse werden am besten an unbegatteten Weibchen beobachtet, welche auch so Eier legen. Die ersten Portionen, die gelegt werden, sind immer die grössten, gleichviel ob eine Befruchtung stattfand oder nicht, und schwanken zwischen 15 und 25 Eiern; die letzten bestehen aus 2—4 Eiern. Ein ♀, welches vom 5ten März bis zu seinem Tode am 31ten Juli beobachtet wurde, legte 38mal, im Ganzen 218 Eier; dabei muss bemerkt werden, dass es schon erwachsen gefangen wurde und wahrscheinlich schon früher gelegt hatte.

Die Eier sind in den ersten 10 Tagen rahmfarben; vom 12ten bis zum 20ten nehmen sie ein rosenfarbenes Kolorit an, das allmälig dunkler wird, so dass sie nach 20 Tagen rot erscheinen. Die Zeit des Ausschlüpfens hängt sehr von der Temperatur ab; in den warmen Monaten findet es nach 20—30, in den kalten nach 30—40 Tagen statt. Einer Temperatur von 0° ausgesetzt, entwickeln sich die Eier nur,

Os ovos quando submetidos a 0° só se evolvem colocados no refrijerador 1 a 2 dias depois da postura; á temperatura quotidiana de 37° não evolvem; alternando os dias no entanto, a evolução se apressa, podendo dezalagar-se em 20 dias.

Larvas: Ao nacer é a larva completamente rozea; 8 horas depois é de colorido pardo-escuro. Excecionalmente suga ao 3.° dia de nacida; comumente, a 1.ª refeição realiza-se do 5.° ao 8.° dia de nacimento durando 5; quando a larva procura espontaneamente a alimentação, fal-o espaçadamente de 15 a 20 dias de intervalo; este prazo é diminuido artificialmente. A 1.ª muda de pele faz-se aos 45 dias, a 2.ª de 2 a 3 mezes, a 3.ª de 4 a 6 mezes; sempre que se dá a ecdize readquire a larva o colorido rozeo que tinha ao nacer, depois da muda a larva não suga nos dias imediatos.

E' imprecindivel o hematofajismo para que se opere a muda, que se não observa nas larvas em jejum de mais de 70 dias, tempo mais que necessario para se terem já verificado 2 mudas. Com a 3.ª muda já se reconhece a que sexo pertencerá a imajem; as refeições já são mais demoradas, durando cerca de 10 a 12'; a alimentação mesmo voluntariamente é procurada quazi que semanalmente; tudo denota uma faze de grande vitalidade.

A 4.ª ecdize assinala o periodo ninfal o qual em condições muito favoraveis de alimentação e temperatura, pode ser atinjido no decurso de 190 dias no minimo; recomeçando o inseto a sugar 2 dias depois da muda. Neste estádio o *barbeiro* faz copiozas refeições de 15 a 20' de duração com mais ou menos 15 dias de intervalo; antes de picar, a ninfa segrega um liquido incolor de cheiro acre e de reação francamente alcalina; até a 3.ª muda esta secreção não é denunciada pelo

wenn die Abkühlung in den ersten zwei Tagen nach dem Legen stattfand; bei einer beständigen Temperatur von 37° entwickeln sie sich nicht, dagegen wird bei unterbrochener Einwirkung die Entwicklung beschleunigt und kann das Ausschlüpfen schon nach 20 Tagen erfolgen.

Larven. — Beim Ausschlüpfen ist die Larve rosenfarben, acht Stunden nachher ist ihr Kolorit dunkelbraun. Ausnahmsweise saugen sie schon am dritten Tage, gewöhnlich findet aber die Blutaufnahme erst am 5ten bis 8ten Tage statt und dauert 5. Obwohl die Larve, sich selbst überlassen, nur in Zwischenräumen von 15—20 Tagen Nahrung sucht, kann diese Frist künstlich verkürzt werden. Die erste Häutung erfolgt nach 45 Tagen, die zweite nach 2 bis 3, die dritte nach 4 bis 6 Monaten; bei jeder Ecdysis nimmt die Larve dasselbe rosenfarbene Kolorit an, wie beim Ausschlüpfen, auch saugt sie an den ersten Tagen nach dem Ausschlüpfen nicht.

Für die Häutung ist die Blutaufnahme eine notwendige Bedingung, da sie bei Larven die über 70 Tage fasten, nicht zu Stande kömmt, während eine solche Frist sonst mehr als hinreicht, um 2 Häutungen zu beobachten. Bei der dritten Häutung lässt sich schon erkennen, zu welchem Geschlechte die Imago gehören wird; die Blutaufnahme dauert schon länger, circa 10—12', die freiwillige Nahrungsaufnahme findet fast wöchentlich statt, was alles eine Phase grosser Vitalität kennzeichnet.

Die vierte Ecdysis eröffnet das Nymphenstadium, welches unter sehr günstigen Ernährungs- und Temperaturverhältnissen im Minimum von 90 Tagen erreicht werden kann, wobei das Insekt zwei Tage nach der Häutung wieder zu saugen anfängt. In diesem Stadium dauert die reichliche Nahrungsaufnahme 15 bis 20' mit Zwischenräumen von 15 Tagen; vor dem Stechen sondert die Nymphe ein farbloses Sekret von scharfem Geruche und deutlich alkalischer Reaktion

cheiro; a faze ninfal dura 42 dias no minimo e, é certamente, o periodo mais critico da vida do *barbeiro* sendo o da mortalidade maior; dias antes de se operar a ultima muda que é a 5.ª, a ninfa não procura mais alimentação, imobiliza-se até a transformação em imajem, que é então de um belo rozeo, levando cerca de 24 horas até adquirir o colorido definitivo o qual começa pelo ferrão, pernas, antenas, cabeça, abdome e finalmente o torax e as azas que aos poucos se vão dezenrugando permanecendo rozeas ainda por algum tempo; os unicos organs que não experimentam modificação são os olhos que permanecem sempre negros.

Um exemplar ♂ completou o ciclo de ovo a imajem em 260 dias; foi este o menor prazo observado. Depois de 8 dias de descanso os adultos podem começar a sugar; a principio refeições de 8 a 10′ com intervalos curtos, posteriormente, feitas num maior espaço de tempo de duração e de intervalo.

Uma ♀ conservada fóra do contato do ♂ pode dezovar 53 dias depois da 1.ª refeição.

Exemplares ♀ ♀ pouco tempo depois da transformação em imajens, aprezentam sensiveis diferenças quanto ás dimensões, comparadas com as dos exemplares que já dezovaram por varias vezes. A cópula é demorada e prolonga-se por muitas horas, nada podendo por enquanto informar qual o tempo que decorre entre esta e a 1.ª postura fecundada. Acreditamos que se realiza uma só cópula porque, já observámos 38 posturas todas de ovos fecundos provenientes de um exemplar capturado o qual, certamente, não dezovava pela 1.ª vez mas que, depois da captura, não esteve mais em contato com ♂♂.

Se adicionarmos aos 271 dias de ovo á imajem de um exemplar ♀ creado em

ab, während bis zur dritten Häutung dieses Sekret sich nicht durch den Geruch verrät. Das Nymphenstadium dauert im Durchschnitt wenigstens 42 Tage und ist zweifellos für den *Conorhinus* die am meisten kritische Periode, in welcher die Mortalität am grössten ist. Schon einige Tage bevor die fünfte und letzte Häutung stattfindet, sucht die Nymphe keine Nahrung mehr und verhält sich regungslos, bis zu ihrer Umwandlung in die Imago, welche dann eine schöne rosige Färbung zeigt; sie braucht ungefähr 24 Stunden um die definitive Färbung anzunehmen, welche am Stachel, den Beinen, Antennen, am Kopfe und am Abdomen beginnt, um endlich auf den Thorax und die Flügel überzugehen, welche sich nach und nach entfalten und noch einige Zeit rötlich bleiben. Die einzigen Organe, welche keine Veränderung erleiden, sind die Augen, welche immer schwarz bleiben.

Ein Männchen vollendete den Entwicklungscyclus vom Ei zur Imago im 260 Tagen, welche der kürzesten beobachteten Frist entsprechen.

Nach achttägiger Ruhe können die erwachsenen Wanzen mit dem Blutsaugen beginnen, zuerst acht bis zehn Minuten lang mit kurzen Zwischenräumen, später während längerer Zeit und mit grösseren Intervallen.

Ein Weibchen, welches mit keinem Männchen zusammenkam, konnte 53 Tage nach der ersten Blutaufnahme Eier legen.

Kurze Zeit nach der letzten Metamorphose zeigen die Weibchen in ihren Dimensionen bedeutende Unterschiede gegen solche, die schon mehrfach Eier gelegt haben.

Die Kopula ist von langer Dauer und kann sich über viele Stunden erstrecken, doch kann ich über die Zeit, die zwischen dieser und der ersten Ablage befruchteter Eier vergeht, keine bestimmt Angabe machen. Ich glaube, dass nur *eine* Begattung stattfindet, da ich beobachtete, dass ein gefangenes Weibchen, welches sicher schon gelegt hatte und nach dem Fange mit keinem Männchen in Berührung kam,

laboratorio, os 53 dias necessarios para a 1.ª postura, supondo que seja este tambem o prazo necessario para os exemplares que tenham copulado, teremos 324 dias para o ciclo completo de ovo a ovo do *Conorhinus megistus*.

E' bom insistir que é este, o prazo minimo possivel, porquanto, as condições artificiais de cultura auxiliaram imensamente a evolução.

Uma ♀ capturada quando já dezovava conservou-se viva em cativeiro mais de 150 dias de modo que, por este dado, podemos afiançar que, deduzindo o tempo de incubação do ovo, pode um *barbeiro* ser infetante pelo menos no espaço de 386 dias o que aliaz deve estar lonje do verdadeiro prazo de evolução, devido á circunstancia da facilidade de refeições na cultura artificial, muito apressar o ciclo evolutivo do *barbeiro*.

Os ♂♂ tambem sugam com muita facilidade, têm contudo, menos atividade que as ♀♀ e são tambem muito menos rezistentes ás intemperies, aos jejuns e, ainda em condições favoraveis, alimentam-se e vivem menos que ellas.

Larvas, ninfas e adultos alimentam-se com mais avidez em temperaturas altas, á temperatura de 14° diminue de muito, a vontade de se alimentar e não possuem a atividade que exercem no tempo quente.

Quanto á profilaxia, deve-se estabelecer como condição primordial para se impedir o dezenvolvimento dos *barbeiros*, o rebôco das cazas de taipa e das frestas e fendas, das paredes das habitações infestadas; o expurgo pelo emprego do gaz sulfurozo deverá ser de grande utilidade. E' sabido que as moradas recem construidas permanecem durante longo espaço de tempo indenes de invazão dos *barbeiros* que paulatinamente, começam a invadir as

noch 36mal Eier legte, welche alle befruchtet waren.

Wenn ich den 271 Tagen, welche ein im Laboratorium gezüchtetes Weibchen zur Entwicklung vom Ei bis zur Imago gebrauchte, die 53, bis zur ersten Eiablage nötigen, Tage zuzähle, unter der Annahme, dass diese Frist auch bei den begatteten Weibchen nötig ist, so erhalten wir für den ganzen Entwicklungscyclus des *Conorhinus megistus* von Ei zu Ei die Zeit von 324 Tagen. Es soll auch betont werden, dass dies die kürzeste notwendige Frist ist, da die künstlichen Bedingungen bei der Zucht die Entwicklung ungemein fördern.

Ein Weibchen, das, nachdem es schon gelegt hatte, gefangen wurde, lebte noch mehr wie 150 Tage in der Gefangenschaft, so dass ich, unter Abzug der Entwicklung im Ei, aus dieser Beobachtung schliessen muss, dass der *Conorhinus* während wenigstens 386 Tagen infektiös sein kann, was übrigens weit hinter der unter gewöhnlichen Verhältnissen gültigen Frist zurückbleiben muss, da die Leichtigkeit der Ernährung bei der Züchtung den Entwicklungscyclus des Schmarotzers ausserordentlich begünstigen muss.

Die Männchen saugen ebenfalls sehr gerne Blut, zeigen sich aber doch weniger aktiv, als die Weibchen, widerstehen auch Witterungsunbilden und Nahrungsmangel weniger und leben — auch unter günstigen Umständen und bei genügender Ernährung — weniger lange, als die Weibchen.

Larven, Nymphen und erwachsene Conorhinen saugen gieriger bei hoher Lufttemperatur; bei 14° nimmt ihr Blutdurst bedeutend ab und sie zeigen sich weniger aktiv, als in der heissen Zeit.

In prophylaktischer Hinsicht muss als erste Bedingung für die Behinderung der Entwicklung des *Conorhinus* das Tünchen der Lehmhäuser und das Ausfüllen von Ritzen und Spalter in infizierten Wohnungen gelten; die Bekämpfung mittelst Schwefeldampf sollte sich sehr nützlich erweisen. Es ist bekannt, dass frisch gebaute Häuser lange Zeit von der Invasion dieser Wanzen verschont bleiben,

habitações, transportados entre os arreios dos animais, como tivemos ocazião de observar em Mato-Grosso, onde os habitantes se utilizam para cavalgar de uma especie de albarda muito propicia a ocultação destes insetos ; acreditamos que esta seja a principal maneira pela qual as habitações izoladas se infestam. Em povoados como os de Itapura onde existem arruamentos, os *barbeiros* podem invadir as rezidencias contiguas e os adultos são perfeitamente aptos a transpor pelo vôo toda a largura da rua.

Tivemos a oportunidade de observar, de uma feita, o abandono total pelos *barbeiros* de uma morada invadida por enxames de *formigas de correição* (Eciton) as quais produzem grandes devastações entre os insetos, obrigando-os a fujirem.

Quando a habitação é abandonada pelos moradores, um mez depois, já se não encontram vestijios dos *barbeiros* que se distribuem pelas cazas da vizinhança.

Havendo certa condição de humidade podem os barbeiros suportar prolongados jejuns. Já possuimos um exemplar ♀ que nos foi enviado de zona limitrofe da Guiana Ingleza, encerrado em pequena caixinha e que chegou ainda vivo ao laboratorio 57 dias apoz a captura.

Raras vezes podem as ninfas ou os adultos fazer refeições posto que pequenas, em dias seguidos, nunca indo além de 3 dias.

Em geral, de cada postura, todos ovos dezalagam.

A ecdize dá-se vagarozamente, levando uma larva 3 horas nesta operação e a ultima muda o dobro pelo menos.

Com as ninfas acontece passarem ás vezes, 30 e mais dias sem que procurem alimentar-se.

Manguinhos, Maio – 1910.

welche sich nur nach und nach in denselben einfinden, besonders durch Vermittlung des Sattelzeuges, wie ich in Matto-Grosso zu beobachten Gelegenheit hatte, wo die Bewohner beim Reiten eine Art von Sattel benutzen, welche für Verstecke dieser Insekten sehr günstige Bedingungen bietet ; ich halte dies bei isolierten Häusern für den hauptsächlichsten Infektionsmodus. In Ansiedelugen, wo, wie in Itapura, Häuserreihen existieren, können die Wanzen die Nachbarhäuser befallen und die erwachsenen *Conorhinen* können auch ganz wohl die Breite einer Strasse überfliegen.

Ich hatte Gelegenheit das plötzliche und vollständige Verlassenwerden einer von Conorhinen infizierten Wohnung zu beobachten ; es geschah dies durch das Eindringen von Scharen von Wanderameisen (Eciton), welche unter den Insekten grosse Verwüstungen machen und sie zur Flucht zwingen.

Wenn eine Wohnung von den Insassen verlassen wird, so finden sich schon nach einem Monate keine Spur von Conorhinen mehr, indem sich letztere auf die Nachbarhäuser verteilen.

Bei genügender Feuchtigkeit kann der Conorhinus ein langes Fasten ertragen. So besass ich ein Weibchen, welches uns von der Grenzzone von British Guyana in einer kleinen Schachtel eingeschlossen übersandt wurde und 57 Tage nach dem Einfangen noch lebend in meine Hände kam.

Selten können Nymphen und erwachsene Conorhinen zwei Tage hintereinander Blut saugen, selbst wenn es sich um geringe Mengen handelt, und niemals mehr als drei Tage hintereinander.

Gewöhnlich schlüpfen sämmtliche Eier eines Geleges aus.

Die Ecdysis geht langsam vor sich, indem eine Larve für diesen Vorgang drei Stunden und ein erwachsener Conorhinus wenigstens das Doppelte gebraucht.

Die Nymphen können manchmal 30 und mehr Tage zubringen, ohne Nahrung zu suchen.

Manguinhos, Mai—1910.

Segunda contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Simulium"

PELO

Dr. Adolpho Lutz.

(Com as Estampas 18 - 21.)

Zweiter Beitrag zur Kenntnis der brasilianischen Simuliumarten

VON

Dr. Adolph Lutz.

(Mit Tafeln 18 - 21)

PARTE GERAL.

Esta segunda comunicação é fundada em material muito rico, colecionado depois de concluida a minha primeira contribuição, que era terminada já bastante tempo antes de ser publicada. Uma parte desse material é devida a contribuições de varias pessoas, entre as quais menciono os colegas Drs. Chagas, Parreiras Horta e Gurgel do Amaral. Do primeiro recebi numerozos borrachudos de Juiz de Fóra e uma especie nova e muito interessante de Lassance (norte de Minas) ; o Dr. Horta contribuiu com larvas e pupas de Mendes e o Dr. Gurgel mandou material muito bom de Alfenas (sul de Minas). A pequena coleção de borrachudos já mencionada que foi feita em Itapura no noroeste de São Paulo pelo Dr. Neiva era de bastante interesse como tambem a constatação de uma especie nossa no interior do Estado de Pernambuco, devida ao Dr. David Madeira. Na rejião de Petropolis fui aju-

ALLGEMEINER TEIL.

Diese zweite Mitteilung stützt sich auf ein sehr reiches Material, welches seit Vollendung meines ersten Beitrages (die seinem Erscheinen längere Zeit voranging) gesammelt wurde. Einen Teil desselben verdanke ich fremder Beihilfe ; es sind hier besonders die Beiträge der Kollegen Drs. Chagas, Horta und Gurgel do Amaral zu erwähnen. Von ersterem erhielt ich zahlreiche Imagines aus Juiz de Fóra und solche einer neuen und sehr interessanten Art von Lassance im Norden von Minas ; Dr. Horta brachte Larven und Puppen von Mendes und Dr. Gurgel sandte ein sehr gutes Material aus Alfenas im Süden von Minas. Sehr interessant war auch eine schon erwähnte, kleine Sammlung von Simulien, welche Dr. Neiva in Itapura im Nordwesten von São Paulo machte und der Nachweis einer hiesigen Art im Innern von Pernambuco, den ich Dr. David Madeira verdanke. Beim Sammeln in Petropolis war mir, wie schon bei anderen Gelegenheiten, Herr

dado como em outras ocaziões pelo Sr. Foetterle e recebi tambem contribuições do Dr. von Luetzelburg. Chegaram tambem larvas e pupas de Anhemby no Tieté (Estado de São Paulo). Tambem as coleções anteriormente feitas, examinadas minuciozamente á luz da nova orientação, ainda forneceram muita couza de bastante valor. A maior parte das coleções foi feita por mim pessoalmente em numerozas excursões a arrabaldes e rejiões vizinhas desta capital, de preferencia logares montanhozos, onde se podia esperar criadouros favoraveis. As altitudes atinjidas eram muito elevadas, colhendo-se nos pontos mais altos, tanto larvas e pupas, como insetos perfeitos. Explorando logares em varias elevações obteve-se assim idéa bastante correta da distribuição vertical. Tambem é permitido afirmar com bastante certeza que a minha coleção contem quazi todas as especies encontradas nesta zona e que só em rejiões mais distantes se poderia contar com novas formas.

A medida que o material aumentava e os conhecimentos se tornavam mais exatos foi precizo distinguir maior numero de especies. Muitas destas são bastante parecidas, aprezentando grandes dificuldades para a discriminação; tornou-se evidente que, devido a certas variações dos exemplares, nem sempre muito perfeitos, não basta a distinção pelo tamanho, côr e dezenho. Foi mesmo precizo empregar constantemente o microscopio na pesquiza de bons caractéres anatomicos, sendo as lupas insuficientes para obter o aumento necessario. Somente a custa de um trabalho extraordinario e de numerozissimos exames microscopicos foi possivel obter os rezultados prezentes, ainda assim, algum tanto imperfeitos.

E' fato provado por grande numero de observações e de grande alcance, que,

Fötterle sehr behilflich und auch von Dr. von Luetzelburg erhielt ich verschiedene Beiträge. Endlich kam noch Larven- und Puppenmaterial aus Anhemby am Tiété im Staate São Paulo. Auch die früher gemachten Sammlungen ergaben, bei genauerer Sichtung an der Hand neuer Erfahrungen, noch manches, was sich als sehr wertvoll erwies. Weitaus den grössten Teil des Materiales habe ich aber selbst auf sehr zahlreichen Excursionen in die nähere und weitere Umgebung von Rio gesammelt, wobei natürlich in den Bergen gelegene Gegenden bevorzugt wurden, da man nur in solchen günstige Brutplätze erwarten kann. An mehreren Orten wurden sehr bedeutende Höhen erreicht und sowohl Larven und Puppen, als auch Imagines, in den höchsten Lagen gesammelt; durch Berücksichtigung von Fundorten in verschiedener Erhebung ergab sich ein ziemlich gutes Bild der vertikalen Verbreitung. Es darf auch mit einiger Sicherheit angenommen werden, dass meine Sammlung nahezu alle in hiesiger Gegend vorkommende Arten umfasst und neue nur aus entlegeneren Lokalitäten zu erwarten sind.

In dem Masse nun, wie das Material zunahm und der Blick sich schärfte, mussten immer mehr neue Arten unterschieden werden. Die Trennung vieler, die einander sehr ähnlich sind, ist mit grossen Schwierigkeiten verbunden und es stellte sich bald heraus, dass, in Folge kleiner Variationen und Unvollkommenheit mancher Exemplare, eine auf Grösse, Farbe und Zeichnung basierte Unterscheidung der Imagines nicht durchzuführen ist. Vielmehr musste beim Suchen nach besseren anatomischen Unterschieden das Mikroscop beständig in Aktion treten; Lupen erweisen sich als unzureichend, da oft starke Vergrösserungen nötig sind. Nur auf Grund einer ganz unverhältnissmässigen Arbeit und zahlloser mikroskopischer Untersuchungen war es mir möglich, die vorliegenden, noch immer in mancher Hinsicht unvollkommenen, Resultate zu erreichen.

numa certa rejião, quazi todas as especies existentes, incluindo as que quazi nunca atacam o homem, podem ser apanhadas em cavalos e mulas, comtanto que as procurem tambem na rejião ventral e no interior das orelhas. Esta ultima rejião é frequentada quazi excluzivamente por certas especies cuja prezença aí se denuncía por um estado eczematozo da pele, aprezentado por todos os équidas de certos logares e consecutivo ás mordeduras repetidas. Mesmo onde, á primeira vista, não parece haver borrachudos, frequentemente se encontram alguns exemplares cheios de sangue no interior das orelhas. Na barriga dos animais, preferem a zona mediana, perto das pernas; as mesmas especies se encontram em numero menor no peito, perto e entre as extremidades anteriores. Outras procuram a crina e penetram entre os pêlos desta. Nestas rejiões, não sómente são de observação mais dificil, mas tambem não conseguem os animais livrar-se dellas. Ainda outras especies procuram a faceira sendo esta localização constante e carateristica, como já mencionei no cazo do *S. nigrimanum*. Embora se possa observar alguns exemplares durante todo o dia, os borrachudos são adaptados a certas intensidades da luz, o que parece devido a particularidades dos seus olhos. Sempre são mais abundantes pouco antes do crepusculo vespertino. O numero de individuos adultos das diversas especies não corresponde, todavia, á frequencia com a qual se encontram as larvas e pupas nos criadouros vizinhos.

Nas aguas que se prestam para criadouros geralmente coexistem algumas especies, o que dificulta a determinação das larvas encontradas. A coloração geral

Sehr bedeutungsvoll erscheint die durch zahlreiche Beobachtungen erwiesene Tatsache, dass die meisten in einer gegebenen Gegend vorkommenden Simulien, auch solche, welche den Menschen gar nicht belästigen, an Pferden und Maultieren gefangen werden können, wenn man nicht vergisst, am Bauche und im Innern der Ohren derselben nachzusehen. Letzterer Ort wird von einzelnen Arten fast ausschliesslich aufgesucht und ihr Vorkommen verrät sich dadurch, dass ihre Stiche dort einen eczematösen Zustand der Haut hervorrufen, den mancherorts alle Pferde und Maultiere aufweisen. Selbst, wenn anscheinend keine blutsaugenden Insekten zu beobachten sind, findet man noch oft im Innern der Ohren einige ganz vollgesogene Exemplare. Am Bauche setzen sich die Simulien meist nahe der Mittellinie und nicht weit von den Hinterbeinen; in geringerer Zahl suchen dieselben Arten die Brust, zwischen den Vorderbeinen und in der Nähe derselben, auf. Andere umschwärmen dagegen die Mähne und dringen zwischen den Haaren derselben in die Tiefe. An allen diesen Stellen sind sie nicht nur schwerer warnehmbar, sondern können auch von den Tieren nicht verscheucht werden. Auch das Gesicht wird manchmal aufgesucht und diese Lokalisation ist für manche Arten charakteristisch, wie bereits für *S. nigrimanum* erwähnt wurde. Obgleich einzelne Exemplare während des ganzen Tages getroffen werden, sind die Simulien doch an gewisse Lichtmengen angepasst, was wohl mit Eigentümlichkeiten der Augen zusammenhängt. Am reichlichsten treten sie kurz vor der Abenddämmerung auf. Die Individuenzahl der einzelnen Imagoarten entspricht dabei aber keineswegs immer der Häufigkeit, in welcher ihre Larven und Puppen an nahegelegenen Brutplätzen auftreten.

Im allgemeinen kommen in Gewässern, welche sich zur Zucht eignen, gewöhnlich mehrere Arten neben einander vor, wodurch die Unterscheidung der einzelnen Larven erschwert wird. Die Körperfärbung ist

destas, pelo menos em certas especies, parece constante durante toda a evolução e por isso pode ser de alguma utilidade na determinação, sempre levando em conta que a côr, bastante variada, do tubo intestinal cheio aparece por transparencia. A placa mental na maioria dos cazos mostra diferenças pouco acuzadas e nas preparações microscopicas raras vezes se encontra em pozição completamente favoravel para o estudo. Por isso convem escolher para a determinação os individuos do ultimo periodo larval que já mostram dos dous lados da extremidade cefalica e perto da cabeça uma mancha escura, correspondente aos apendices respiratorios da pupa formados já debaixo da pele e aparecendo por transparencia. E' verdade que estes organs tubulares são reduzidos a um espaço pequeno sendo as partes terminais dobradas ou enroladas em forma de espiral, mas, podem ser libertadas e dezenroladas, permitindo, assim, reconhecer o tipo da ramificação. Os « *trichomas* » e ganchos da pupa são facilmente viziveis e pode-se reconhecer até os esboços embrionais das pernas, mas sem a coloração carateristica. A ramificação dos tubos respiratorios é constante em quazi todas as especies e basta para a sua determinação. No cazo de tratar-se de especie desconhecida procuram-se então pupas correspondentes que contêm a mosca já quazi perfeita o que facilmente se conhece; esta por sua vez é tirada do seu envolucro e aproveitada para a determinação. Deste modo e com a paciencia necessaria obtêm-se informações tanto mais valiozas quanto, até em especies com os adultos muito parecidos, a pupa é facilmente distinguida.

O cazulo das diversas especies aprezenta diferenças em estrutura e tamanho; geralmente tem a forma de cartucho de papel, mais ou menos achatado do lado de fixação e com a marjem liza ou algumas vezes franjada; consiste de tecido porozo

zwar bei einigen Arten, anscheinend während der ganzen Entwicklung, konstant und lässt sich in beschränktem Masse verwenden; man muss dabei jedoch in Rechnung ziehen, dass der gefüllte Darmkanal durchscheint und die Färbung seines Inhaltes grossem Wechsel unterworfen ist. Die Mentalplatte zeigt bei den meisten Arten nur unbedeutende Unterschiede und stellt sich zudem im Präparate nur selten ganz günstig ein. Man hält sich daher bei der Bestimmung am besten an Individuen, welche bereits vor der letzten Häutung stehen und beiderseits nahe am Kopf einen dunkeln Fleck aufweisen, welcher durch die bereits unter der Haut angelegten und durchschimmernden Respirationsanhänge der Puppen gebildet wird. Zwar sind diese röhrenförmigen Gebilde auf einen kleinen Raum zusammengedrängt und ihre Endteile sind umgebogen oder schneckenförmig aufgerollt; sie lassen sich aber ziemlich leicht herauspräparieren und so weit entfalten, dass man den Verweigungstypus erkennt. Die Haare und Häkchen der Puppe sind ohne weiteres sichtbar und man erkennt sogar die Anlagen der Beine, jedoch ohne die spätere Färbung. Die Veraestelung der Kiemenröhren ist bei den einzelnen Arten konstant und genügt fast immer zur Erkennung der Species. Handelt es sich um eine unbekannte Art, so sucht man dann entsprechende Puppen, welche eine ganz oder nahezu reife Imago enthalten, was man leicht erkennt. Man kann dann wiederum diese herauspräparieren und zur Bestimmung verwenden. Auf dieser Weise gewinnt man, bei genügender Geduld, um so wertvollere Anhaltspunkte, als auch Arten, deren Imagines sich sehr ähnlich sind, sich im Puppenzustande deutlich unterscheiden.

Das Gespinnst zeigt bei manchen Arten Verschiedenheiten in Grösse und Struktur; gewöhnlich hat es die Form einer auf der Unterlage mehr oder weniger abgeplatteten Papierdüte mit glattem, seltener aufgefranstem Rande; es ist ganz locker aus einer gelbgrauen Seide gewoben, die von zwei, in der reifen Larve leicht wahr-

feito de seda de côr amarela acinzentada, formada em duas grandes glandulas sericiparas, facilmente observadas na larva madura. Em algumas especies o tecido não parece ter a forma de cartucho, mas semelha uma rede irregular cujos fios geralmente são carregados de sujeira ou de algas e no qual a pupa se encontra preza pela ponta; mas mesmo nestes cazos parece haver um rudimento de cartucho.

No abdome da pupa ha numerozos ganchos e espinhos que talvez poderiam ser aproveitados na classificação. Mas, deixando de lado as dificuldades que aprezentam ao exame, em muitas especies parecem pouco diferentes. De maior utilidade, talvez, sejam dous pequenos ganchos ou espinhos encontrados na ultima extremidade do abdome de muitas especies.

Na extremidade anterior geralmente a pele da pupa, em extensão variavel, aprezenta-se finamente granulada, o que rezulta de numerozos granulos de côr mais carregada. Alem disso existem pequenos discos carregando pelos, que chamarei « *trichomas* », porque raras vezes são simples ou dicotomos, mas geralmente ramificados. A sua forma não é sem utilidade para a determinação das especies.

O papel dominante na classificação das pupas é, todavia, ocupado pelos apendices branquiais da extremidade anterior. Consistem de um sistema de tubos ramificados, fechados na ponta e munidos de anéis ou fios espirais pouco nitidos até perto da baze, aprezentando assim alguma semelhança com traquéas. Somente numa especie nova, o *S. botulibranchium*, falta esta escultura, havendo apenas aspeto granular produzido por espinhos muito miudos e parecidos com escamas, assemelhando-se, assim, á porção bazal das outras especies. Nem por isso são ramificados, mas a sua forma é tão diferente e irregular que não se parece com qualquer outra especie conhecida. (Apenas entre as especies afri-

nehmbaren, grossen Spinndrüsen geliefert wird. Bei einigen Arten wird anscheinend ein unordentliches Netz gebildet, dessen lockere Fäden meist mit Algen oder Schmutz verfiltzt sind; in diesem sitzt die Nymphe, wie mit der Spitze hineingesteckt; doch findet sich auch dann das Rudiment einer, meist sehr dünnen, Düte.

Die Puppe zeigt am Hinterleibe zahlreiche Häkchen und Dornen, deren Form, Zahl und Anordnung vielleicht bei der Klassifikation verwertet werden könnten. Aber, abgesehen davon, dass sie sich nicht immer deutlich präsentieren, scheinen sie sich auch bei vielen Arten kaum zu unterscheiden. Eher lässt sich noch die Form zweier Häkchen benutzen, die bei manchen Arten ganz am Hinterleibe der Puppen stehen.

Am Vorderende ist die Puppenhaut gewöhnlich in wechselnder Ausdehnung fein chagriniert, was durch zahlreiche intensiver gefärbte Körnchen bewirkt wird. Ausserdem stehen auf kleinen Scheiben haarartige Gebilde, welche ich als *Trichome* bezeichnen werde. Sie sind selten einfach oder dichotom, häufiger mehrfach verzweigt und ihre Bildung ist für die Bestimmung nicht ganz ohne Wert.

Weitaus am wichtigsten für die Klassifikation sind jedoch zweifelsohne die Kiemenanhänge des Vorderendes. Dieselben bestehen aus einem, nach aussen geschlossenen, Systeme verzweigter Röhren, die meist bis in die Nähe der Basis etwas unregelmässige und undeutliche Ringe oder Spiralfäden aufweisen, wodurch sie etwas an Tracheen erinnern. Nur bei *Simulium botulibranchium* n. sp. sind sie ganz ungeringelt, aber von feinsten Schuppendörnchen chagriniert, wie die basale Portion der anderen Arten; trotzdem sind sie auch verzweigt, aber ihre ganze Form ist so verschieden und anscheinend unregelmässig, dass sie sich mit keiner anderen Art vergleichen lässt. (Nur bei afrikanischen Arten scheinen wenigstens vermitttelnde Formem zu existieren, deren Kiemenanhänge verbreitert und nicht röhrenförmig sind; doch ist ihre Anord-

canas parece haver formas intermediarias com apendices branquiais alargados e não tubulares, sendo, porem, a sua dispozição muito mais regular). Em todas as outras formas estudadas o numero e a dispozição das ramificações fórmam um carater constante e seguro ; até hoje em centenares de pupas examinadas só encontrei uma onde de um lado faltava uma ramificação, o que deve ser considerado como fato patolojico. (*) Todavia a altura onde se observa estas ramificações póde variar um tanto, visto que nem sempre é completamente egual dos dous lados. A forma dos ramos, com uma exceção unica, é quazi cilindrica ; apenas perto da sua extremidade se tornam ás vezes mais finos ou aprezentam excecionalmente (em uma especie só) um alargamento fuziforme. A terminação reprezenta um segmento de esfera ou se faz em ponta subconica, ás vezes um pouco despegada. O calibre do tronco e dos ramos principais corresponde geralmente á soma das ramificações. A baze do tronco está muito aproximada da abertura do estigma anterior da *imago* de modo que as traquéas nacendo neste parecem comunicar diretamente com o tubo branquial. O comprimento deste varía não somente nas diversas especies, mas tambem nos individuos da mesma, mas neste cazo conserva a proporção com o tamanho da pupa. (Esta é sempre muito menor quando contém um macho, que se conhece já cedo pela formação especial dos olhos). As ultimas ramificações geralmente aprezentam comprimento e grossura egual, mas existem exceções. Muitas minucias de estrutura são mais facilmente apreciadas na pele vazia da pupa (depois da saida do mosquito) sendo que esta se conserva ainda por muito tempo por dentro do cazulo em estado quazi perfeito.

No mosquito adulto a pele exterior só raras vezes é completamente liza e sem brilho ; quazi sempre mostra reflexos claros, variando de intensidade conforme a

(*) Quando ha cerca de 20 ramificações parece o numero lijeiramente variavel, tornando-se tambem a contajem muito dificil.

nung eine regelmässigere). Bei allen anderen untersuchten Arten bildet die Zahl und Anordnung der Verzweigungen einen konstanten und zuverläsisgen Charakter und ich habe unter Hunderten von Puppen nur eine bemerkt, bei welcher, auf der einen Seite ein Ast unterdrückt war, was als eine Missbildung aufzufassen ist. (*) Dagegen scheint die Höhe, in welcher die einzelnen Verzweigungen abgehen, einigermassen wechseln zu können, da sie nicht einmal immer auf beiden Seiten ganz gleich ist. Die Form der Aeste ist, mit einer Ausnahme, eine nahezu cylindrische ; doch können sie sich gegen das Ende zu stärker vorjüngen, während ausnahmsweise bei einer Art gerade hier eine spindelförmige Erweiterung auftritt. Der Abschluss am Ende kann in Form eines Kugelabschnittes stattfinden oder es ist eine nahezu kegelförmige, manchmal etwas abgesetzte, Spitze vorhanden. Das Kaliber des Stammes und der Hauptäste entspricht im allgemeinen der Summe der Verzweigungen ; die Basis des ersteren liegt nahe der vorderen Stigmenöffnung der Imago, so dass die daselbst mündenden Tracheen mit der Atmungsröhre zu kommunizieren scheinen. Die Länge ist je nach der Art verschieden und variiert auch individuell, jedoch unter Wahrung der Proportion zur Länge der Puppe. (Letztere ist immer bedeutend kleiner, wenn sie ein Männchen einschliesst, welches durch die Bildung der Augen schon frühzeitig zu erkennen ist). Die letzten Aeste sind gewöhnlich von gleicher Länge und Dicke ; doch giebt es Ausnahmen. Manche feinere Details erkennt man am besten, nach dem Ausschlüpfen der Imago, an der leeren Puppenhaut, welche sich im Innern des Gespinstes noch lange Zeit fast unbeschädigt erhält.

Bei der Imago ist die äussere Haut nur selten ganz glatt und glanzlos ; meist zeigt sie helle Reflexe von, je nach der Region verschiedenem, Intensitätsgrad und eine fei-

(*) Erreicht die Zahl der Aeste die Nähe von 20, so scheint sie etwas zu schwanken, doch ist dann auch die Zählung sehr shwierig.

rejião, e um aspeto mais ou menos finamente granular ; excecionalmente na cabeça aprezenta finissimas pontas papilares. Muitas vezes ha logares cobertos de uma crosta alvacenta, um tanto irregular, dotada de forte brilho nacarado ; estas manchas muito decorativas são constantes e carateristicas para as especies, mas podem tornar-se apagadas em exemplares mal conservados. Em conjunto com as escamas piliformes douradas do escudo formam ornamentos muito brilhantes que sómente com o microscopio podem ser apreciados em toda a sua beleza.

Nas antenas a existencia de pubecencia é geral e digna de nota ; póde-se considerar como bastante certo que não deixa de ter a sua utilidade e isto se póde afirmar especialmente em referencia a algumas cerdas terminais curtas que nunca faltam.

Os autores geralmente dão os palpos como compostos de quatro articulos, mas SCHROTTKY nas suas descrições fala em cinco ; realmente o articulo bazal dos autores nas especies indijenas compõe-se frequentemente de dois segmentos quazi ou completamente separados ; fatos semelhantes são observados nos *culicidas* e esta segmentação, nem sempre facil de perceber em exemplares espetados, não tem a importancia que parece merecer *a priori*.

No segundo segmento dos autores e terceiro de SCHROTTKY observei em todas as especies examinadas um orgam de senso que considero constante e que me parece dever servir ao olfato. No *S. paraguayense* de SCHROTTKY me parece especialmente distinto. Consiste em excavação profunda e quazi esferica com abertura circular na face superior (Est. 19, Fig. 28) (*). Os dois ultimos articulos são sempre anelados como

(*) Em especies de *Ceratopogon* ha um aparelho igual e no mesmo lugar.

nere oder gröbere Körnung, die ausnahmsweise am Kopfe zu feinsten und dicht gedrängten Spitzchen auswächst. Manche Stellen sind mit einer, nicht ganz homogenen, weisslichen Kruste überzogen, welche auffallend starken Perlmutterglanz aufweist ; solche dekorative Flecken sind konstant und bei der Bestimmung wertvoll, können aber bei schlecht konservierten Exemplaren undeutlich werden. Im Verein mit den goldglänzenden Haarschüppchen des Scutums bilden sie höchst effecktvolle Schmuckfärbungen, welche indessen erst unter dem Mikroskope zur vollen Geltung kommen.

An den Antennen ist die allgemeine Verbreitung der feinen Pubescenz auffallend ; dass sie nicht ohne Bedeutung ist, darf man wohl als sicher ansehen ; noch mehr gilt dies von einigen konstanten, terminal stehenden Börstchen.

Die Palpen werden gewöhnlich als viergliedrig angegeben ; nur SCHROTTKY beschreibt fünf Segmente ; es rührt dies daher, dass das Basalglied der Autoren, bei unseren Arten häufig aus zwei nahezu oder ganz getrennten Segmenten besteht ; es kommen ja auch bei den Culiciden ähnliche Verhältnisse vor und hat diese Gliederung, die übrigens an gespiessten Exemplaren meistens nicht leicht zu beurteilen ist, nicht die Bedeutung, welche man ihr *a priori* zuzuschreiben geneigt sein könnte.

Im zweiten, resp. nach SCHROTTKY dritten, Segmente habe ich bei allen daraufhin untersuchten Arten, ein Sinnesorgan gefunden, das ich für konstant halte und als Geruchsorgan anspreche. Besonders deutlich fand ich es bei *S. paraguayense* SCHROTTKY. Es besteht aus einer sehr tiefen, nahezu kugeligen Aushöhlung mit ziemlich kreisrunder oberer Oeffnung. (Taf. 19, Fig. 28) (*). Die letzten zwei Palpenglieder sind immer geringelt, ähnlich, aber deutlicher, als die Respirationsanhänge der Puppen.

Die Stigmen treten bei den grösseren

(*) Auch bei *Ceratopogon*arten findet sich ein solcher Apparat an derselben Stelle.

os tubos branquiais das pupas, porém mais distintamente.

Os estigmas em formas de aberturas redondas são facilmente percebidos com aumento fraco tratando-se de especies maiores.

A côr dos halteres em muitas especies é quazi identica, mas em outros cazos, bastante numerozos, é de grande valor para a determinação.

A estrutura do abdome merece especial menção; como em muitos outros sugadores de sangue, em estado vazio é bastante pequeno, mas póde distender-se extraordinariamente pela injestão de sangue. Para o facilitar a natureza providenciou em sentido duplo, aprezentando o abdome profundas dobras, ora lonjitudi-tudinais, ora transversais. A prezença de pregas lonjitudinais numerozas e conchegadas, que se póde chamar canelação, não é constante, embora observada em muitas especies; assim póde, ás vezes, servir de carater distintivo. Este geralmente é mais acuzado no lado inferior dos primeiros segmentos abdominais, sendo observado já no mosquito ainda incluido na pupa; assim não se póde tratar apenas de um fenomeno devido á contração de um abdome antes muito distendido, como facilmente se podia supôr. As dobras transversais profundas, lembrando o fole de uma camara, são devidas á constrições intersegmentais, especialmente acuzadas. As marjens dos segmentos que, em estado vazio, se acham mais ou menos escondidos, muitas vezes mostram coloração mais clara, o que se distingue melhor no abdome distendido. Geralmente prevalece uma ou outra especie de corrugação, mas tambem podem ser egualmente dezenvolvidas.

A respeito do emprego da coloração para a classificação convem acentuar que os adultos deixam o cazulo perfeitos e capazes de voar; por isso, tambem a coloração é sempre completa, a menos que se tenha

Arten schon bei schwacher Vergrösserung deutlich als runde Oeffnungen hervor.

Die Farbe der Halteren stimmt zwar bei zahlreichen Arten nahezu überein, ist aber doch in vielen Fällen zur Unterscheidung von grossem Nutzen.

Eine besondere Erwähnung verdienen noch die Verhältnisse des Abdomens, welches, wie bei vielen anderen Blutsaugern, in leerem Zustande ziemlich klein ist, aber bei der Blutaufnahme eine ausserordentliche Vergrösserung erfährt. Für dieselbe ist in zweierlei Weise vorgesorgt, indem das Abdomen in leerem Zustande stark quer- oder längsgefaltet ist. Das Auftreten zahlreicher, dichtstehender Längsfalten an den einzelnen Ringen, das man als Kannelierung oder Riefelung bezeichnen kann, ist nicht bei allen (obwohl bei sehr vielen) Arten vorhanden; es kann daher gelegentlich als Unterscheidungsmerkmal dienen. Am deutlichsten ist dieses Merkmal gewöhnlich an der Unterseite der ersten Bauchringe zu erkennen. Es findet sich schon bei der noch in der Puppe enthaltenen Imago, ist also nicht, wie man leicht vermuten könnte, eine Schrumpfungserscheinung in Folge vorhergehender starker Ausdehnung. Eine starke Querfaltung nach Art des Balges einer Kamera kömmt dadurch zu Stande, dass sich zwischen den einzelnen Ringen ungewöhnlich tiefe Einschnürungen bilden. Die, auf diese Weise, im leeren Zustande mehr oder weniger versteckten Ränder der Segmente sind oft heller gefärbt, was dann am gefüllten Abdomen deutlicher hervortritt. Gewöhnlich wiegt die eine oder andere Art der Faltenbildung vor, doch können sie auch gleichmässig entwickelt sein.

Ueber die Verwendung der Färbung bei der Klassifikation wäre noch zu bemerken, dass die Imagines schon perfekt und flugfähig ausschlüpfen und in Folge dessen unausgefärbte Exemplare nur beobachtet werden, wenn sie direkt aus der Puppe herauspräpariert wurden. Die Färbung is daher im Ganzen eine ziemlich konstante, variiert aber doch bei manchen

tirado o mosquito da pupa antes do tempo. Pela mesma razão, geralmente, a coloração dos individuos não difere ; ha todavia algumas especies um tanto variaveis. A's vezes se observam individuos muito escuros o que, pelo menos numa parte dos cazos, póde ser attribuido a previa injestão copioza de sangue. Pelo menos observei num exemplar vivo de *S. scutistriatum* que neste cazo alguns dias depois todo o corpo, incluindo as pernas, se aprezentava muito mais escuro ; nem se pode excluir que possa haver algum aumento de tamanho nestas condições.

A coloração iriante das azas, dependendo da grossura destas, differe um tanto conforme as especies.

A morfolojia do revestimento de escamas e pêlos mostrou-se do maior valor para a determinação das especies, embora não pareça recomendar-se para a formação de generos ou sub-generos. Como já mencionei ha tranzições de pelos para escamas ; pelos curtos e achatados, que muitas vezes formam o tomento do escudo, em outras especies são substituidas por escamas lineares indubitaveis e, em outros cazos, pelos fuziformes cedem o logar a escamas lanceoladas estreitas. Convem unir estas formas, que só com poder bastante forte podem ser discriminadas, sob o nome de formas de tranzição. Emquanto que muitas especies, principalmente as maiores, ao lado de pelos mostram quando muito. formas de tranzição, outras aprezentam nas pernas escamas distintas e um tanto mais largas. A sua forma, o mais das vezes, é lanceolar ou espatulada e variam mais no comprimento do que na largura. Podem ser carinadas e terminar em pequenas pontas. Em vista da sua forma, parecida á das petalas de varias flores, chamo-lhes *petaloides*. No mosquito espetado percebem-se melhor quando são claros sobre fundo escuro, mas nas preparações microscopicas as escamas escuras dis-

Arten einigermassen. Es kommen gelegentlich sehr dunkle Exemplare vor, was vielleicht auf eine vorangegangene reichliche Blutaufnahme zurückzuführen ist ; jedenfalls habe ich bei einem lebenden Exemplare von *S. scutistriatum* gesehen, dass nach einer solchen der ganze Körper mit Einschluss der Beine sich in den nächsten Tagen bedeutend dunkler färbte. Auch ist eine geringe Grössenzunahme nicht ausgeschlossen.

Die irisirenden Farben an den Flügeln hängen von der Dicke derselben ab und bei den verschiedenen Arten etwas verschieden.

Für die Bestimmung der Species hat sich die Beschaffenheit des Haar- und Schuppenkleides als äusserst wertvoll erwiesen, während es sich nicht empfehlen würde, dieselbe als Merkmal für Gattungen oder Subgenera zu benutzen. Wie schon gesagt, gehen Haare und Schuppen in einander über : kurze abgeplattete Haare, wie sie häufig das Tomentum des Scutums bilden, werden bei anderen Arten durch deutliche lineäre Schüppchen ersetzt und an Stelle von spindelförmigen Haaren treten linearlanzettliche Schüppchen. Alle diese, nur bei stärkerer Vergrösserung unterscheidbaren, Gebilde werden am besten als Uebergangsformen bezeichnet. Während viele und besonders die grösseren Arten neben Haaren höchstens Uebergangsformen zeigen, weisen andere an den Beinen etwas breitere deutliche Schuppen auf. Dieselben sind meist lanzettlich oder spatelförmig und von verschiedener Länge, während die Breite weniger wechselt. Sie können gekielt sein und in feine Spitzchen auslaufen. In Folge der Aehnlichkeit ihrer Form mit derjenigen von Blumenblättern bezeichne ich dieselben als *petaloid*. Am gespiessten Insekte sieht man sie am besten, wenn sie hell sind und auf dunklem Grunde stehen, während man im mikroskopischen Präparate wiederum die dunklen besser sieht. Am Scutum sind die Schüppchen immer schmal und selten petaloid, gehen dann aber auch auf Frons und Clypeus über, was einen guten

tinguem-se melhor. No escudo, as escamas sempre são estreitas e raras vezes petaloides, mas neste cazo são encontradas tambem na fronte e no clipeo o que forma um bom carater distintivo, como acontece tambem com a dispozição das escamas do escudo em feixes e estrias. Nos tarsos as formas de transição são frequentes.

As escamas das pernas podem ser percebidas no mosquito ainda incluido na pupa, si o seu dezenvolvimento fôr bastante acuzado. Sendo as escamas assaz caducas, deve-se preferir exemplares bem conservados que se escolhe pela prezença do tomento do escudo.

Na descrição e definição das especies não me ocupei dos organs de copulação, porque não tinha bastante material de machos, e nas femeas a investigação da estrutura é dificil e não parece ter muita utilidade pratica. Os machos geralmente se parecem tanto com as femeas que a determinação da especie não encontra dificuldades serias. São sempre menores e distinguem-se, ás vezes, por ornamentações mais brilhantes, e por serem as pernas mais peludas. Têm sempre unhas tridentadas.

As unhas necessitam exame minuciozo e repetido porque os dentes secundarios ocupam uma pozição bastante escondida e quando auzentes podem ser simuladas pelo angulo bazal proeminente ou pela ponta da outra unha. A sua auzencia é um bom carater de especie por ser bastante rara.

Na parte especial deste trabalho darei suplementos ás especies descritas e a descrição de muitas pupas e insetos adultos de especies novas com chaves para a determinação destas.

PARTE ESPECIAL.

Aos dados contidos na comunicação anterior tenho de acrecentar varios outros, o que farei uzando a mesma ordem de espècies enumeradas:

1. S. rubrithorax Lutz.

Esta especie se distingue facilmente de quazi todas as outras, por ser o fundo do

Charakter bildet, ein anderer wird durch ihre Gruppierung in Büscheln und Reihen gegeben. An den Tarsen sind Uebergangsformen sehr häufig.

Die Schuppen der Beine lassen sich schon an der Puppe erkennen, wenn dieselbe eine, bereits ziemlich ausgebildete, Imago einschliesst. Da sie etwas hinfällig sind, sollten stets gute Exemplare bevorzugt werden, die am Vorhandensein der Scutumbekleidung kenntlich sind.

Von den äusseren Genitalien habe ich bei der Artbeschreibung und Bestimmung abgesehen, da nicht genügend Material von Männchen vorliegt und eine genaue Feststellung der Formverhältnisse bei den Weibchen schwierig und kaum lohnend sein dürfte. Die Männchen sind gewöhnlich den Weibchen so ähnlich, dass ihrer Artbestimmung keine besondere Schwierigkeit im Wege steht. Sie sind immer kleiner und manchmal durch lebhaftere Schmuckfärbungen und stärkere Behaarung der Beine ausgezeichnet. Ihre Krallen sind immer dreizähnig.

Bei den Krallen der Weibchen ist eine genaue und wiederholte Untersuchung nötig, weil der Sekundärzahn ziemlich versteckt ist und andererseits die vorspringende basale Ecke der nämlichen oder die Spitze der anderen Kralle einen fehlenden Zahn vortäuschen kann. Das Fehlen ist übrigens selten und daher ein guter Speciescharakter.

Im speziellen Teile dieser Arbeit gebe ich Nachträge zu den beschriebenen Arten, sowie die Beschreibung zahlreicher neuer Imagines und Puppen und Schlüssel zur Bestimmung.

SPEZIELLER TEIL.

Zu den in der letzten Mitteilung gemachten Angaben ist noch Verschiedenes nachzutragen, was ich in der Reihenfolge der daselbst aufgezählten Arten tun werde.

1. S. rubrithorax Lutz.

Diese Art unterscheidet sich von den meisten andern leicht durch den roten

torax colorido em vermelho, o que aparece principalmente no escudo; da especie seguinte difere pelas dimensões menores, as unhas com dentes e o revestimento do escudo consistindo em escamas piliformes compridas e estreitas, com brilho de ouro muito mais acuzado. Podem aparecer bastante apertadas, mas nunca ocultam a linha mediana que tem uma côr algum tanto mais escura. Por fóra desta existe no fundo de cada lado mais uma linha lonjitudinal similhante; estas trez linhas formam frequentemente o centro de faxas lonjitudinais mais escuras que, em iluminação lateral, não mostram o brilho cinzento que se percebe no resto do fundo. Este dezenho que todavia nem sempre aparece claramente, aproxima a especie da seguinte. Nestas duas, como em algumas outras especies maiores, vê-se no escudo, na parte declive da marjem anterior, uma estria transversal larga e escura, com as extremidades pontudas e viradas para traz, em forma de chifres. Na marjem anterior e dos dois lados o fundo, mais granulado e mais brilhante, forma uma tarja clara.

O abdome é sempre fortemente canelado e o lado ventral frequentemente amarelo-acinzentado em extensão assaz grande.

Nas pernas as porções claras, situadas acima dos joelhos, ás vezes são avermelhadas ou enegrecidas, devido talvez ao sangue injerido. O revestimento consiste em pêlos ou formas de tranzição que são lijeiramente alargadas na extremidade do femur do ultimo par.

O tamanho varia de menos de trez para mais de quatro milimetros. As femeas adultas são encontradas, principalmente pouco antes do crepusculo vespertino, sobre a barriga dos cavalos e de preferencia em lugares mais elevados. Foram apanhadas, em maior numero, em PETROPOLIS, JUIZ DE FORA e na SERRA DA BOCAINA.

As larvas e pupas são geralmente encontradas em agua muito ajitada, em cachoeiras e cascatas menores e maiores, ás vezes nas proprias pedras. As larvas distinguem-se pelo tamanho que pode

Grundton des Thorax, der besonders am Scutum hervortritt, von der nachfolgenden jedoch—ausser durch etwas kleinere Dimensionen- und deutlich gezähnte Krallen — besonders durch die Bekleidung des Scutums. An letzterem zeigen die langen und schmalen Uebergangsformen einen viel ausgesprocheneren Goldglanz; sie können sehr dicht stehen, lassen aber stets die etwas dunklere Mittellinie frei. Ausser der letzteren findet sich auf dem Grunde noch jederseits eine ähnliche Längslinie; diese drei Linien stehen oft auf dunkleren Striemen, welche nicht den grauen Schimmer zeigen, wie ihn der Rest des Grundes bei seitlicher Beleuchtung bietet. Durch diese Zeichnung, welche aber nicht immer deutlich ist, nähert sich die Art der Folgenden. Bei beiden und ausserdem auch bei verschiedenen anderen, grösseren Arten findet sich ganz vorne am abschüssigen Scutumrande ein breiter dunkler Querstrich, dessen Enden hornartig zugespitzt und nach hinten gebogen sind. Am Vorderrande und auf beiden Seiten ist der Grund in Form eines Saumes stärker gekörnt und dem entsprechend mehr weiss schimmernd.

Das Abdomen ist stets sehr stark längs gefaltet und unten nicht selten in grösserer Ausdehnung graugelb.

Die hellen Teile oberhalb der Kniee sind, besonders bei grösseren Exemplaren, machmal etwas gerötet oder geschwärzt, was vielleicht Folge einer Blutaufnahme ist. Die Bekleidung besteht aus Haaren oder Uebergangsformen, die am Ende des letzten Schenkels etwas verbreitert erscheinen.

Die Grösse variierte von unter drei bis über vier Millimeter. Es wurden ziemlich zahlreiche Weibchen in JUIZ DE FÓRA, PETROPOLIS und in der SERRA DA BOCAINA gefangen. Man findet sie namentlich gegen Abend am Bauch der Pferde. Sie scheinen hoch gelegene Regionen zu bevorzugen.

Larven und Puppen finden sich gewöhnlich nur im strudelnden Wasser, in Stromschnellen, sowie kleineren und grösseren Fällen, zum Teile direkt an den Steinen. Die Larven zeichnen sich durch

alcançar 12 mm. e mais. Têm o lado ventral claro e o dorsal enegrecido, o que é devido a manchas verde-negras, como se conhece pelo exame microscopico.

O cazulo exterior (Fig. 9 e 26) tem uma parte anterior, separada e fazendo angulo com o plano de fixação, cujas paredes formam rede de malhas largas e terminam em franjas achatadas. No meio desta, percebe-se geralmente a capsula cefalica larval, proveniente da ultima muda e tendo ao lado e atraz os tubos respiratorios da pupa. Estes têm oito galhos iguais, acuminados e bastante curtos. Parece que não ha tricomas. Por estes caracteres, combinados com o grande tamanho, pode facilmente ser diferenciada de outras especies de pupas com o mesmo numero de tubos respiratorios. Os olhos das formas adultas salientam-se já na pupa pelo seu pigmento vermelho, principalmente os grandes dos machos, encontrados em pupas bastante menores.

As larvas e pupas desta especie só foram encontradas em pequeno numero nas cercanias da capital, mas recebi ultimamente material abundante, colecionado no Rio das Velhas perto de Lassance por um empregado do Instituto. Como se vê da Fig. 26, os cazulos frequentemente eram aglomerados em massas achatadas cobrindo as pedras maiores e menores. Destas, eu extraí varios insetos adultos com os carateres de *simulium rubrithorax*, o que afasta qualquer duvida a respeito das pupas. Alem disto, recebi do mesmo lugar algumas femeas adultas, apanhadas em cavalos, todas assaz pequenas, mas semelhantes ás extraidas das pupas. As pernas eram bastante escuras. Nos dois cazos havia, tanto na fronte, como no clipeo, escamas estreitas que sempre faltavam nos meus exemplares antigos e de dimensões maiores. Pode tratar-se apenas de variações ou pode ser que existam duas especies semelhantes, ambas com o escudo vermelho e unhas munidas de dentes, mas só por meio de criações é que este ponto poderá ser rezolvido.

bedeutende Grösse aus, die 12 mm. erreichen und übertreffen kann. Sie haben eine helle Bauch- und eine schwärzliche Rückseite; letztere zeigt unter den Mikroskope schwärzliche Flecken. Das Gespinnst der Puppen (Fig 9, 26) hat einen zur Unterlage schräg gerichteten Vorbau, dessen Wände aus einem sehr weitmaschigen Netze bestehen und in bandartige Fransen auslaufen. Im Innern desselben findet sich gewöhnlich die bei der Häutung abgestossene Kopfkapsel der Larve; nach hinten und seitlich sieht man die Respirationsanhänge der Puppe. Letztere bestehen aus acht sehr gleichmässigen und ziemlich kurzen Aesten, die am Ende zugespitzt sind. Trichome scheinen der Puppe zu fehlen. Dadurch und durch ihre bedeutende Grösse unterscheidet sie sich leicht von anderen Arten mit derselben Zahl von Respirationsanhängen. Die Augen der Imago sind bei der Puppe durch ein lebhaft rotes Pigment ausgezeichnet, besonders die grösseren der Männchen, welchen eine weit kleinere Puppe entspricht.

Ich fand Larven und Puppen dieser Art um Rio immer nur spärlich, erhielt aber kürzlich durch einen Institutsdiener aus Lassance ein reichliches, im Rio das Velhas gesammeltes Material. Wie aus Fig 26 ersichtlich, waren dort die Gespinnste oft zu flachen Massen vereinigt, welche Felsen und Steine überzogen. Aus denselben wurden durch Präparation verschiedene Imagines mit den Merkmalen des *S. rubrithorax* gewonnen, so dass über deren Zugehörigkeit kein ernstlicher Zweifel bestehen kann. Vom selben Orte erhielt ich überdies einige an Pferden gefangene Imagines, die zwar alle ziemlich klein waren, aber sonst den aus den Puppen gewonnenen entsprachen; die Beine derselben waren ziemlich dunkel. Stirne und Clypeus zeigen in beiden Fällen schmale Schüppchen, die bei meinen älteren und grösseren Exemplaren vermisst werden. Die Entscheidung der Frage, ob es vielleicht zwei ähnliche Arten mit gezähnten Krallen und rotem Scutum giebt, oder ob nur Varietäten vorliegen, kann wohl nur durch Züchtung erhalten werden.

2. **Simulium scutistriatum** Lutz.

E' esta especie geralmente bastante rara ; consegui todavia arranjar mais algumas femeas, provenientes de varios lugares, variando em altura de poucos metros até 900 m. acima do mar (Xerém, Mendes, Juiz de Fora, Terezopolis). Distinguem-se pelo tamanho que alcança em 5 mm. de comprimento e pelas escamas distintas, bastante compridas e abundantes, que ocupam a fronte e o clipeo. A côr é alvacenta, como tambem as do escudo são mais palidas do que na maioria das outras especies ; quando estão bem conservadas, aprezentam tambem um agrupamento em feixes, principalmente na parte anterior. A fronte e o clipeo têm um brilho branco, ás vezes muito intenso, e a superficie coberta de saliencias papilozas muito finas ; as marjens laterais e a posterior do escudo, o metanoto e o dorso do primeiro segmento abdominal tambem podem apreezntar forte brilho claro. Nos palpos distinguem-se cinco segmentos.

A côr e o dezenho do fundo do escudo são um tanto variaveis ; pode aquella virar em vermelho de tijolo lembrando o *S. rubrithorax*. As faxas lonjitudinais podem ser mais ou menos apagadas quando entre ellas não aparece o fundo distintamente mais claro, como em regra se dá ; todavia, a linha mediana lonjitudinal é geralmente distinta. Variações tais são encontradas principalmente em exemplares procedendo de elevações maiores, sem dar motivos suficientes para o estabelecimento de especie nova. O abdome é fortemente canelado aprezentando com frequencia aneis mais claros.

A baze da haste dos halteres é de côr escura, o capitulo branco-amarelo, ás vezes, principalmente por fóra, um pouco pardacento ou avermelhado.

A côr das pernas tambem pode variar um pouco ; geralmente têm ellas os segmentos superiores bastante enfuscados, mas cobertos de escamas piliformes claras ; a coxa do ultimo par parece ser sempre

2. **Simulium scutistriatum** Lutz.

Von dieser im Ganzen recht seltenen Art habe ich noch einige Exemplare gesammelt, und zwar von verschiedenen Standorten, die zwischen wenigen und ca. 900 Meter über Meer liegen (Xerém, Mendes, Juiz de Fóra, Theresopolis). Ausser durch ihre Grösse, welche 5 mm. erreichen kann, zeichnen sie sich dadurch aus, dass Stirn und Clypeus — mit deutlichen ziemlich langen und oft sehr reichlichen, Schüppchen besetzt sind. Diese sind weisslich und auch am Scutum blasser, wie gewöhnlich ; sie sind daselbst auch, wenn vollzählig, besonders im vorderen Teile leicht gebüschelt. Stirn und Clypeus haben einen, oft sehr intensiven, weissen Schimmer und der Grund daselbst ist deutlich fein papillär ; auch Seiten- und Hinterrand des Scutums, sowie der Metathorax und die Rückenfläche des zweiten Abdominalsegmentes können einen hellen Glanz zeigen. Die Palpen haben fünf Segmente.

Farbe und Zeichnung des Grundes des Scutums wechseln etwas ; erstere kann ins Ziegelrote übergehen, wodurch sie *S. rubrithorax* ähnlich wird. Die Striemen können mehr oder weniger verwischt sein, indem der Grund zwischen denselben nicht deutlich heller erscheint, wie sonst der Fall ist ; doch ist meist die mittlere Längslinie sehr deutlich.

Solche Abweichungen finden sich besonders bei den Exemplaren aus höheren Lagen, ohne dass die Aufstellung einer anderen Art genügend begründet werden könnte. Das Abdomen ist sehr stark längs gefaltet und zeigt öfters deutlich hellere Ringe.

Die Basis des Halterenstammes ist dunkel, das Kapitulum weissgelb und manchmal, besonders aussen, etwas rötlich oder bräunlich angelaufen.

Auch die Beine, die in der Farbe etwas wechseln können, sind meist in den oberen Teilen ziemlich stark gebräunt und mit hellen Haarschüppchen besetzt ; die Coxa des letzten Paares scheint immer dunkel zu sein, während Trochanter und

escura, mas o trocanter e a baze do femur podem ser mais claros. Não ha escamas petaloides nas pernas. O dente das unhas falta ou ha apenas um rudimento insignificante.

Os meus exemplares eram todos de sexo feminino e foram apanhados no homem e no cavalo. Os primeiros estados não estão conhecidos.

3. S. pernigrum Lutz (=montanum Phil ??).

Restitui á terceira especie o nome em primeiro lugar escolhido por mim, visto que a sua identidade com a especie chilena por varias razões não deixa de ser bastante duvidoza. Consegui reunir não somente grande numero de femeas (acima de um cento), mas achar tambem as respetivas larvas e pupas em varios lugares da Serra da Bocaina. As primeiras foram apanhadas na barriga de cavalos, numa altura acima de 1500 m.; não atacavam quazi os homens que os acompanhavam. Ha pouca couza que acrecentar á descrição: o comprimento importa em 2 a 3 mm., só excecionalmente poderiam alcançar o tamanho atribuido ao *S. montanum*. O abdome é um tanto canelado. Não existem escamas petaloides em parte alguma.

As larvas foram encontradas nas aguas de um regato, onde aprezentavam forte correnteza. A pupa (Fig. 19 e 20) é caraterizada por quatorze tubos respiratorios de cada lado; nacem de seis troncos principaes, dos quais quatro têm uma bifurcação simples e dois outros uma segunda bifurcação num dos galhos. Todas as ramificações ficam bastante perto da baze. Os ramos têm grossura igual e terminam na mesma altura em ponta obtuza. Os tricomas são simples, mas colocados em pequenos discos (como os ramificados). A formação de cazulo lejitimo é duvidoza; as pupas examinadas pareciam quazi livres e cobertas por sujeira.

4. S. hirticosta Lutz.

Desta especie colecionei cazulos bastante numerozos em Petropolis, delles

Femurbasis hell sein können. Petaloide Schuppen kommen an den Beinen nicht vor. Der Krallenzahn fehlt oder es ist nur ein ganz unbedeutendes Rudiment vorhanden.

Meine Exemplare sind sämmtlich Weibchen und wurden teils am Menschen, teils am Pferde gesammelt.

Die ersten Stände sind noch unbekannt.

3. S. pernigrum Lutz (= montanum Phil.??).

Ich gebe meiner dritten Art den von mir ursprünglich gewählten Namen wieder, da die Identifizierung mit der chilenischen Art doch sehr unsicher ist. Es ist mir gelungen, nicht nur zahlreiche (weit über hundert) Weibchen derselben Art in der Serra da Bocaina zu sammeln, sondern auch die zugehörigen Puppen aufzufinden. Erstere wurden in einer Höhe von über 1500 M. am Bauche der Pferde gefangen; den Menschen greifen sie kaum an. Der Beschreibung ist nur wenig beizufügen:

Die Grösse beträgt 2—3mm; ausnahmsweise könnte die für *montanum* angegebene Länge wohl erreicht werden. Das Abdomen ist etwas längsgefaltet.

Es finden sich nirgends petaloide Schüppchen.

Die Larven wurden im Wasser eines kleinen Baches gefunden, wo derselbe eine starke Strömung zeigte. Die Puppe (Fig. 19, 20) ist dadurch ausgezeichnet, dass sie jederseits 14 Kiemenröhren zeigt, welche aus 6 Hauptstämmen hervorgehen, von denen vier sich einfach gabeln, während bei zweien ein Ast sich weiter teilt. Sämmtliche Teilungen sind nicht sehr weit von der Basis entfernt. Die Zweige sind gleich dick und enden in gleicher Höhe mit einer abgestumpften Spitze. Die Trichome sind einfach und stehen auf kleinen Scheibchen. Ob ein richtiges Gespinnst gebildet wird, ist zweifelhaft, da die untersuchten Puppen anscheinend frei in einem Ueberzuge von Schmutz sich befanden.

4. S. hirticosta Lutz.

Von dieser Species habe ich seither in Petropolis ein reiches Puppenmaterial

obtendo machos e femeas em numero superior a cincoenta. Muitos exemplares foram examinados ainda incluzos no cazulo. No macho, os olhos são holopticos, côr chocolate com brilho vermelho e reflexos claros e mostram na parte superior (que excede bastante a metade do olho) facetas maiores; as antenas são ocraceas na baze, enfuscadas para cima, mas densamente cobertas de pubecencia branca. A tromba e os palpos são escuros. O escudo, a olho nú, é chocolate aveludado; no microscopio vêm-se escamas um tanto mais claras, de côr de bronze escura, finas e curtas e, mais para traz, pêlos escuros. As pleuras são pretas. Na parte posterior do escudo ha uma mancha nacarada, que se conhece mesmo com o tomento bem conservado.

Abdome escuro, todo o lado inferior e o de cima, em parte, coberto de pó de brilho alvacento. Na marjem posterior do primeiro anel e na extremidade do abdome ha pêlos compridos com brilho de ouro.

Azas como as da femea, halteres todo pretos, mas com reflexo claro apagado.

Pernas: O fundo quazi completamente enegrecido, mas com reflexos claros e muitas escamas estreitas ou pêlos de brilho branco. Nos joelhos anteriores parece haver escamas doiradas, curtas mas largas; outras iguais, porém brancas, existem nas coxas e trocanteres. Nos femures posteriores ha pêlos compridos e pretos sobre fundo de brilho prateado; num exemplar percebe-se tambem do lado exterior escamas compridas de forma lanceolar, quazi linear, que, vistas de lado, se parecem com pêlos. Nos dois sexos o metatarso mostra uma paleta bem caraterizada, o tarso seguinte é um pouco alongado e de grossura mediocre; não ha incizura bem acentuada, mas no lugar desta ha uma depressão lijeira. Estes caracteres parecem unir as subespecies *Eusimulium* e *Prosimulium* de ROUBAUD, lembrando a pupa mais o tipo da segunda.

A larva é avermelhada tendo manchas vermelhas sobre fundo claro, E' semeada de pêlos muito curtos e bastante finos, mais

gesammelt, aus welchem ich mehr wie fünfzig Männchen und Weibchen erhielt, während andere noch in der Puppenhülle eingeschlossen untersucht wurden. Bei den Männchen sind die zusammenstossenden Augen chokoladenbraun und rot; dabei im oberen, weit mehr, als die Hälfte betragenden Teile grob facettiert; im kleinen unteren Segmente sind dagegen die Facetten klein, aber beide zeigen helle Lichter. Die Antennen sind ganz unten an der Basis ockergelb, nach oben braun, aber dicht bedeckt mit weisser Pubescenz. Rüssel und Palpen dunkel. Rückenschild dunkel chokoladenbraun, makroskopisch sammetartig, mikroskopisch mit etwas helleren, feinen, und kurzen Haarschüppchen von dunkler Bronzefarbe, nach hinten zu mit dunklen Haaren. Am Hinterrande ein perlmutterglänzender Fleck, der auch bei erhaltenem Tomentum erkennbar ist. Pleuren schwarz.

Abdomen dunkel, die ganze Unterseite mit weisslich glänzendem Staube; oben zum Teile ebenso. Am Rande des ersten Ringes und am Hinterende lange, etwas goldglänzende Haare.

Flügel wie beim Weibchen. Halteren in toto schwarz, mit mattem hellerem Schimmer.

Beine: Grund ziemlich gleichmässig schwarz, aber mit weissem Glanze und vielen weissschimmernden Haarschüppchen. Vorderste Knie anscheinend mit kurzen, aber breiten goldenen Schüppchen, ebensolche, aber weissliche stehen an den Coxen und Trochanteren. An den Hinterschenkeln auf silberglänzendem Grunde lange schwarze Haare; daneben auch einige linearlanzettliche Schuppen. Palette des Metatarsus bei beiden Geschlechtern wohl entwickelt, nächster Tarsus mässig lang und dick, ohne tiefe Incisur, aber mit deutlicher Kerbe. Diese Charaktere scheinen zwischen den Subspecies *Eusimulium* und *Prosimulium* von ROUBAUD zu vermitteln, während die Puppe mehr dem letzten Typus gleicht.

Die Larve erscheint rötlich, in Folge roter Flecken auf hellem Grunde. Sie ist mit kurzen und feinen Härchen besetzt, die

abundantes na parte posterior e substituidos por espinhas transparentes no processo ventral.

Na pupa os tubos respiratorios se dividem por bifurcação ou, mais raramente, por trifurcação, até formar de cada lado cerca de vinte ramificações muito finas, terminadas em ponta ovoide. O seu numero me parecia variar entre 20 e 24. A pupa tem a forma de costume, sendo a pele finamente granulada munida de tricomas ocraceos, não ramificados, na extremidade anterior e no lado ventral da posterior, onde ha dois ganchos quazi retos e só lijeiramente curvados. O cazulo em forma de cartucho é muito fino, cobrindo sómente dois terços da pupa; está geralmente cheio de sujeira, com fios soltos, fixando a sua baze e muitas vezes unindo-a a cazulos de outras especies, como *perflavum* Roubaud, *incrustatum n. sp.* e *clavibranchium n. sp.*, entre os quais se acham frequentemente. Mais raro é encontrar-se pequenos grupos ou colonias maiores formadas só por esta especie. Comquanto geralmente um pouco escassa, existe em varias elevações e não pode ser considerada rara; depois dos dois lugares perto de São Paulo a encontrei em mais sete do estado do Rio de Janeiro, a saber: Caixa d'agua do Rio d'Ouro, Terezopolis, Petropolis, num pequeno rio perto de Vassouras, em outro na raiz da Serra de Petropolis, finalmente na Serra da Bocaina e na estação de Capivary (E. de F. Oeste de Minas). Tratava-se sempre de larvas e cazulos; a *imago* só raras vezes é apanhada, o que indica habitos especiais e diferentes.

5. **S. pertinax** Kollar (=**venustum** Say ??).

Em nosso meio de observação é esta a unica especie que persegue ao homem e por isso, não obstante a insuficiencia da descrição, justifica-se a identificação com a especie assim denominada por Kollar. Não se dá isso com a especie de Say, porque a distancia das zonas de observação (oferecendo condições de clima muito diferentes) e a falta de acordo nas decrições

hinten dichter stehen und am ventralen Fortsatz durch helle Dornen ersetzt werden.

Die Kiemenröhren der Puppe spalten sich durch einfache Gabelung, nur selten durch Dreiteilung, bis jederseits ca. 20 ungewöhnlich feine Aeste gebildet sind, welche in eiförmige Spitzen auslaufen. Die Zahl schien mir nicht ganz konstant, sondern zwischen 20 und 24 schwankend. Die Puppe, welche sonst nicht von der gewöhnlichen Form abweicht, hat eine fein chagrinierte Haut, einfache ockergelbe Trichome am Vorder- und ventral am Hinterende, das zwei fast gerade Häkchen trägt. Das dütenförmige Gespinnst ist sehr dünn und bedeckt die Puppe nur zu zwei Dritteln; gewöhnlich ist es mit Schmutz überzogen und durchsetzt und durch lockere Fäden mit der Nachbarschaft verbunden. Nicht selten adhäriert es an Gespinnsten anderer Arten, wie *perflavum*, *incrustatum* n. sp., und *clavibranchium* n. sp. Seltener finden sie sich in kleineren Gruppen oder selbst grösseren reinen Kolonien.

Obgleich immer etwas spärlich, ist die Art doch nicht sehr selten; sie findet sich zudem in allen Höhenlagen; so fand ich sie, ausser an den zwei Fundorten in São Paulo, noch an sieben solchen im Staate Rio de Janeiro, nämlich am Rio d'Ouro (Reservoir) und am Fusse der Serra von Petropolis, bei Vassouras, Petropolis und Theresopolis, endlich in der Serra da Bocaina (Bonito) und bei der Station Capivary. Diese Funde beziehen sich alle auf Larven und Puppen, während die Imago nur ganz ausserordentlich selten gefunden wird, was auf Besonderheiten in der Lebensweise derselben deutet.

5. **S. pertinax** Kollar (=**venustum** Say ??).

Diese Art ist die einzige, welche in unserem Beobachtungsgebiet den Menschen ernstlich belästigt, wodurch sich — trotz ganz ungenügender Beschreibung — die Identifizierung mit der Kollar'schen Art rechtfertigt. Weniger sicher ist dies mit der Say'schen Art; vielmehr legt die Entfernung der Fundorte, der Unterschied in den Klimaverhältnissen und die Angaben

das unhas e do tomento do escudo indicam, que se trata apenas de especie um tanto semelhante. Até entre nós ha especies muito parecidas, como tive de convencer-me, de modo que a identidade com uma das especies norteamericanas só poderia ser provada por uma comparação exata, incluindo tambem as pupas.

Acrecentarei á descrição anterior que o tomento do escudo consiste de elementos piliformes, de comprimento mediocre e muito estreitos. São bastante caducos e só em exemplares bem conservados formam um revestimento denso, sem agrupamento em feixes ou estrias. A sua côr é de bronze doirada, um pouco avermelhada, a qual sobre o fundo cinzento de ardozia produz o efeito macroscopico de amarelo acinzentado. As escamas petaloides tipicas faltam completamente nesta especie. As azas são iriantes em vermelho e verde. A haste dos halteres é infuscada na baze. O abdome é distintamente canelado. Em tamanho (ca. de 2—2,5 mm. de comprimento) ocupa uma pozição intermediaria; exemplares muito grandes ou pequenos, o mais das vezes, pertencem a outras especies como por exame minuciozo se reconhece.

Larvas e pupas, que com bastante probabilidade pertencem a esta especie, são encontradas nos mesmos lugares onde ocorre a imago, comquanto com menos frequencia que a que se devia esperar, talvez por ainda ignorarmos as condições mais favoraveis.

As larvas são de tamanho medio e se parecem com aquellas do *S. perflavum*; as pupas variam bastante em tamanho sendo os machos geralmente muito menores. Têm de cada lado seis tubos branquiais muito compridos, com extremidade subconica, um pouco destacada, nacendo de tres troncos dos quais o primeiro se bifurca imediatamente, o segundo um pouquinho mais a cima e o terceiro depois de outra distancia igual. Em todos os cazos, embora se observem algumas variações, os pontos de divizão são pouco distantes da baze.

Do Rio de Janeiro até Santos esta

über das Tomentum am Schilde und die Krallen den Gedanken nahe, dass es sich nur um eine etwas ähnliche Species handelt. Selbst hier habe ich mich davon überzeugen müssen, dass solche vorkommen; nur durch genaue Vergleichung, die sich auch auf die Puppen bezieht, könnte somit die Identität mit einer nordamerikanischen Art festgestellt werden.

Zu der früheren Beschreibung habe ich noch nachzutragen, dass das Tomentum des Scutums aus schmalen und mässig langen, haarartigen Gebilden besteht, die ausserdem ziemlich hinfällig sind. Nur bei frischen Exemplaren stehen sie dicht, ohne Büschel oder Reihen zu bilden. Ihre Farbe ist eine etwas rötliche Goldbronze, die mit dem schiefergrauen Grunde gemischt, makroskopisch graugelb erscheint. Deutliche petaloide Schuppen finden sich bei dieser Art nirgends. Die Flügel irisieren rot und grün. Der Halterenstiel ist an der Basis braun. Das Abdomen ist deutlich geriefelt. Die Art ist mittelgross (Länge ca. 2—2 $^1/_2$ mm.): sehr grosse oder kleine Exemplaren stellen sich gewöhnlich als zu einer anderen Art gehörig heraus.

Larven und Puppen, deren Zugehörigkeit wahrscheinlich ist, werden da gefunden, wo auch die Imago vorkömmt, indessen weniger zahlreich und häufig, als man erwarten sollte. Vielleicht beruht dies auf ungenügender Kenntnis der Verhältnisse, die ihnen besonders zusagen.

Die Larven sind mittelgross und gleichen denjenigen von *S. perflavum*; die Grösse der Puppen variiert stark, indem die männlichen oft sehr klein sind. Sie haben beiderseits sechs lange Kiemenröhren, die am Ende subconisch und etwas geknöpft sind und aus drei Stämmen hervorgehen, von denen der erste sich sofort, der zweiter etwas höher gabelt und der dritte, derselben Distanz entsprechend, noch höher eine Zweiteilung eingeht. Immerhin und trotz leichter Variationen sind die Teilungsstellen von der Basis nur wenig entfernt.

Von Rio bis Santos findet sich diese Art überall am Fusse der Berge und in den tieferen Lagen derselben, nicht nur auf

especie é encontrada sempre na raiz e nas partes inferiores das serras, tanto na terra firme, como nas ilhas maiores (Ilhas S. Sebastião e Grande). Persegue o homem, entrando mesmo nas cazas, e ataca tambem os cães. Com o aumento de altitude torna-se mais rara ou dezaparece completamente, sendo substituida por outras especies parecidas.

No *S. pertinax* lejitimo o femur do ultimo par de pernas é amarelo, como os outros. O que foi citado como *var. infuscata* corresponde a algumas outras especies que por um exame minuciozo podem ser discriminadas com toda certeza, sendo tambem os seus habitos diferentes. Tambem o que se citou dos Estados Unidos como variedades de *S. venustum* Say devem ser especies diferentes; pelo menos, quando as pupas mostram mais tubos respiratorios, pode isto ser considerado certo.

O nosso *pertinax* tem pupas semelhantes ás do *venustum* Say, considerado tipico, mas parecem um pouco diferentes da figura de Johannsen e a sua descrição da imago não concorda completamente com os carateres de *pertinax*. Exemplares que recebi de Washington com o nome de *venustum* são distintamente diferentes do *pertinax* lejitimo e não parecem ter dentes nas unhas. Tambem a côr do escutelo é pardo claro: no resto concordam bastante bem com a descrição de Johannsen.

6. S. perflavum Roubaud.

6. *S. perflavum* Roubaud (provavelmente identico com *ochraceum* Walker) foi encontrado recentemente e em grande numero em diversos lugares, dos quais Lassance em Minas é o mais setentrional.

As larvas são sociais e bastante transparentes, de modo que, em regatos com a agua tinjida por ocre ou barro vermelho, podem aparecer amarelas ou vermelhas pela transparencia do intestino cheio. Esta alteração da agua não as prejudica, comtanto que esteja bastante ajitada e arejada. Pelo resto ellas têm, como muitas outras especies, manchas esverdeadas na face dorsal. Cazulo e pupa geralmente têm um

dem Festlande, sondern auch auf geeigneten grösseren Inseln. Sie verfolgt den Menschen bis in die Häuser und auch Hunde haben von ihnen zu leiden. Mit zunehmender Höhe wird sie selten oder verschwindet ganz, während andere ähnliche Arten auftreten.

Beim ächten *S. pertinax* ist der hinterste Schenkel gelb, so wie die andern. Was als *var. infuscata* angeführt wurde, entspricht anderen Arten, die sich bei näherem Studium unzweifelhaft unterscheiden lassen, wie auch ihre Gewohnheiten andere sind. Auch die angeblichen Varietäten von *S. venustum* Say aus Nordamerika sind wahrscheinlich artverschieden; sicher ist es für diejenigen, die im Puppenzustande mehr Kiemenröhrenäste aufweisen. Zwar hat *pertinax* ähnlich gebildete Puppen, wie *venustum*, doch scheinen sie mit der Abbildung von Johannsen nicht ganz übereinzustimmen; auch seine Beschreibung der Imago von *venustum* passt nicht ganz auf *pertinax*. Exemplare, die ich als *venustum* von Washington erhalten habe, sind von dem ächten *pertinax* deutlich verschieden und scheinen keinen Krallenzahn zu besitzen. Auch ist das Scutellum hellbraun; sonst stimmen sie mit der Beschreibung von Johannsen ziemlich gut überein.

6. S. perflavum Roubaud.

Die Art, die vielleicht mit *ochraceum* Walker identisch ist, wurde neuerdings in grosser Anzahl und an verschiedenen Plätzen nachgewiesen, von denen Lassance in Minas bisher der nördlichste ist.

Die Larven leben gesellig und sind ziemlich durchsichtig, so dass sie in mit Eisenocher oder roter Erde gefärbten Bächen, in Folge des Durchscheinens des gefüllten Darmes, gelb oder rot erscheinen können. Solche und andere Verunreinigungen des Wassers schaden ihnen nicht, wenn dasselbe nur genügend bewegt und gelüftet ist. Sie haben aber ausserdem

tamanho medio e a côr um pouco mais clara que em outras especies. O tronco principal do aparelho respiratorio de cada lado divide-se em trez galhos, dos quais o interior se bifurca imediatamente e os outros dois correm paralelos para fóra, cada um dando nacença a dois ramos dirijidos para cima. Todos os ramos são bastante curtos e mostram na extremidade uma ponta conica, um pouco destacada. A pele da pupa é finamente granulada, os tricomas são em parte simples, em parte dicotomos ou ramificados ; na extremidade posterior da pupa ha dois espinhos ou ganchos, quazi retos. O cazulo tem a forma de cartucho de papel e a côr cinzento-amarela sendo formado de rede de fios pouco finos e um tanto achatados.

O inseto adulto não tem escamas petaloides ; o abdome é canelado e as unhas sempre munidas de dente distinto. Foi apanhado em varios lugares no ato de chupar sangue de cavalos, de preferencia no interior das orelhas mas o pequeno numero de femeas, obtidas deste modo, está em dezacordo franco com a frequencia e a riqueza dos criadouros.

7. S. orbitale n. n.

Escolho este nome, que se refere aos habitos do inseto para substituir o de *S. nigrimanum* MACQ, empregado no meu ultimo trabalho, visto ser incerto e pouco provavel, que o macho, descrito por MACQUART, pertença a esta especie. A' descrição anterior convem acrecentar o seguinte :

A côr do fundo é enegrecido, com brilho branco, mais ou menos, intenso ; apenas no abdome é, mais ou menos, pardacento, principalmente nos primeiros aneis e em baixo. As antenas na parte maior são fortemente pubecentes e fracamente apenas na baze avermelhada. O tomento do escudo é bastante carateristico, de côr extraordinariamente clara, alvacenta ou branca ; misturada com aquella do fundo aparece macroscopicamente branco-acinzentada. O tomento é formado por escamas muito es-

(wie viele andere Larven) grünliche Flecken auf der Dorsalseite. Gespinnst und Puppen sind im allgemeinen mittelgross und von etwas hellerer Farbe, wie bei anderen Arten. Der Hauptstamm des Respirationstubus zerfällt in drei Aeste, von denen sich der Innerste sofort gabelt, während die beiden anderen sich gegenüber stehen und jeder noch zwei Seitenzweige abgiebt. Alle Zweige sind ziemlich kurz und zeigen am Ende eine aufgesetzte konische Spitze. Die Haut der Puppe ist fein chagriniert, die Trichome sind einfach, gabelig oder verzweigt ; am Hinterende stehen zwei Spitzen oder kaum gebogene Häkchen. Das Gespinnst ist graugelb dütenförmig und von einem Netzwerk wenig feiner und etwas abgeplatteter Fäden gebildet.

Die Imago weist keine petaloiden Schüppchen auf. Der Hinterleib ist längsgefaltet. Die Krallen sind immer deutlich gezähnt. Sie wurde zwar an verschiedenen Orten beim Saugen an Pferden und zwar besonders im Innern der Ohren gefangen ; doch steht die geringe Zahl der so erhaltenen Weibchen in einem auffallenden Gegensatze zu der Häufigkeit und Ergiebigkeit der Brutplätze.

7. S. orbitale n. n.

An Stelle des früher gebrauchten Namens NIGRIMANUM *Macq.* wähle ich diese neue Bezeichnung, welche sich auf die Gewohnheiten der Mücke bezieht. Es ist ganz unsicher und wenig wahrscheinlich, dass das Männchen von MACQUART zu dieser Art gehörte. Zu der früheren Beschreibung ist noch Einiges nachzutragen :

Die Grundfarbe ist schwärzlich mit mehr oder weniger ausgesprochenem, weissem Schimmer ; nur am Abdomen mehr braun, besonders an den ersten Ringen und unten. Die Antennen sind grösstenteils stark pubescent, nur an der rötlichen Basis schwach. Das Tomentum des Scutums ist ziemlich charakteristisch von ungewöhnlich heller, ganz oder nahezu weisser Farbe, die sich mit derjenigen des Grundes makroskopisch zu einem hellen Weissgrau

treitas, grupadas em pequenos feixes, formando estrias lonjitudinais, um tanto indistintas, das quais uma pode ocupar a linha mediana. Na marjem posterior do escudo as escamas são mais compridas e no escutelo seguem direção quazi transversal : a fronte e o clipeo têm revestimento igual ao do escudo e não sómente pêlos. O metanoto mostra um brilho branco bem acuzado.

Abdome muito anelado, fazendo dobras como o fole de uma camara ; a canelação geralmente é menos acuzada. No primeiro anel os pêlos marjinais são quazi brancos ; ha outros iguais distribuidos sobre a face dorsal dos ultimos segmentos. No segundo, quarto e quinto segmento ha manchas nacaradas dorsolaterais, formando uma linha pontuada.

Azas iriantes em vermelho ; halteres com a haste escura sendo o capitulo amarelo, como já mencionámos.

As escamas das pernas são, pela maior parte, piliformes e em parte brancas, distinguindo-se bem do fundo escuro ; sómente na tibia do ultimo par são bastante alargadas e petaloides.

As unhas não têm dente.

Como já foi dito, esta especie não ataca gente ; é todavia facilmente observada nos cavalos, onde ella prefere a faceira e principalmente as marjens orbitais, como já foi referido. Reconhece-se tambem pelo revestimento da cabeça e do escudo, em combinação com as unhas inermes. No Tieté ocorre tambem no Salto de Itapura, onde foi encontrada pelo Dr. Neiva ; em Alfenas foi colecionada pelo Dr. Gurgel do Amaral. Possuo tambem um exemplar que recebi ha muitos anos da Fazenda Borda do Mato perto de Franca (Estado de São Paulo) ; ambos estes lugares se acham perto do Rio Grande ; deve ocorrer tambem no Paraiba, porque apanhei um exemplar em Benjamin Constant, perto deste rio.

Quando este estudo já se achava concluido, consegui receber larvas e pupas desta especie. Achei-as entre material de

mischt. Es besteht aus schmalen Haarschüppchen, die in kleinen Büscheln stehen und nicht sehr deutliche Längslinien bilden, von denen oft eine ganz median steht. Am Hinterende des Scutums sind diese Gebilde etwas länger und stehen am Schildchen nahezu quer ; auch Stirne und Clypeus sind ähnlich bekleidet, wie das Scutum, und nicht bloss behaart. Das Metanotum zeigt deutlich weissen Schimmer.

Abdomen stark geringelt oder quergefaltet, wie der Balg einer Kamera ; Kannelierung gewöhnlich weniger deutlich. Am ersten Ringe sind die randständigen Haare weisslich ; ebensolche sind über die Rückenfläche der letzten Segmente zerstreut. Am 2ten, 4ten und 5ten Segmente stehen dorsolaterale Perlmutterflecke, welche als punktierte Linie erscheinen.

Flügel rot irisierend ; Halteren am Stiele dunkel, Kapitulum blassgelb, wie beschrieben.

An den Beinen finden sich zumeist haarartige Schüppchen, die sich teilweise durch helle Farbe vom dunklen Grunde abheben ; an der letzten Tibia sind sie jedoch deutlich verbreitert und petaloid. Die Krallen tragen keine Zähne.

Wie schon gesagt, greift diese Art den Menschen nicht an ; ihre Gegenwart ist aber leicht durch den Fang an Pferden zu konstatieren, wo sie, wie gesagt, das Gesicht und besonders die Augenhöhlenränder bevorzugt. Auch sonst ist sie, besonders durch die Bekleidung von Kopf und Notum und die zahnlosen Krallen, leicht zu erkennen. Am Tieté findet sie sich auch beim grossen Wasserfall von Itapura, wo sie Dr. Neiva für mich sammelte, während sie Dr. Gurgel do Amaral in Alfenas fing ; ich besitze auch ein Exemplar, welches ich vor Jahren von der Fazenda Borda do Matto bei Franca (S. Paulo) erhielt. Letztere Fundorte liegen im Stromgebiete des Rio Grande. Auch am Parahyba muss sie vorkommen, da ich ein Exemplar bei Benjamim Constant erbeutete.

Als diese Arbeit bereits abgeschlossen war, erhielt ich endlich Larven und Puppen obiger Art. Dieselben fanden sich unter

borrachudos que mandei colecionar no Salto Grande do Paranapanema no Estado de São Paulo. De pupas maduras obtive por preparação cuidadoza alguns machos e femeas, estabelecendo a identidade destas ultimas pelo tomento caracteristico e as unhas sem dente. No macho os olhos são vermelhos na parte de cima e as unhas são trifidas como de costume. O tomento é dourado e os seus elementos não formão nem feixes, nem estrias. O escudo aprezenta duas faxas nacaradas obliquas partindo dos hombros e podendo estender-se até á linha mediana fundindo-se então com terceira faxa semilunar tarjando a marjem posterior do escudo. Assim aparecem nos machos menos desenvolvidos que se tira dos cazulos ; em outros, quazi perfeitos, parecem mais curtos, menos brilhantes e mais encobertos pelo tomento. Não obstante haver diferenças tão acuzadas os ♂♂ e ♀♀ descritos pertencem indubivelmente a mesma especie.

As larvas são bastante volumozas, podendo alcançar um comprimento de 8 mm. A sua coloração é do tipo mais comum, com manchas verdenegras sobre fundo bastante transparente, lijeiramente esbranquiçado ; distinguem-se todavia facilmente por um carater especial : em toda a superficie cutanea existem aculeos de forma ovoide e côr amarelada bastante distantes entre si. O cazulo assaz grande é formado por seda pardacenta, bastante grossa e escura e a sua abertura circular acha-se na extremidade de um vestibulo curto, com marjem liza e espessada sem franjas. Os apendices respiratorios da pupa são muito curtos e pouco aparecem por fora ; lembram espinhas ramificadas tendo cerca de 20 galhos de forma de cone alongado ; não são anelados e terminão em pontas agudas de côr preta. A's vezes, mas nem sempre, são cobertos de pequenos tuberculos. Os tricomas são ramificados e a parte anterior da pele é granulada. (Fig. 35, 36, 39, 40).

Simulienmaterial, welches für mich an einem anderen Wasserfalle des Staates São Paulo, am Salto Grande do Paranapanema, gesammelt worden war. Es gelang mir, aus den reifen Puppen einige Männchen und Weibchen herauszupräparieren und die Identität der letzteren durch das charakteristische Toment und die ungezähnten Krallen sicher zu stellen. Beim Männchen sind die Augen oben rot und die Krallen, wie gewöhnlich, dreizähnig. Das Toment ist goldfarben und seine Elemente stehen diffus, weder Streifen, noch Bueschel bildend. Auf dem Scutum stehen zwei schräge Perlmutterbinden, welche in der Schultergegend entspringen und sich in der Mittellinie treffen können. Sie fliessen dann mit einer dritten zusammen, welche den Hinterrand des Scutums halbmondförmig säumt. So findet man sie bei noch jungen Exemplaren in der Puppe ; bei älteren erscheinen sie kuerzer, weniger intensiv glaenzend und mehr vom Toment bedeckt. Trotz der auffallenden Unterschiede ist die Zusammengehörigkeit der beschriebenen ♂♂ und ♀♀ sicher.

Die Larven sind ziemlich gross und dick ; sie könnnen eine Länge von 8 mm. erreichen. Ihre Färbung ist die gewöhnlichste, weisslich durchscheinend mit schwarzgrünen Flecken, doch sind sie an einem besonderen Kennzeichen leicht zu erkennen. In regelmässigen und ziemlich weiten Abständen finden sich nämlich auf der ganzen Hautoberfläche eigentümliche eiförmige Stacheln von gelblicher Farbe. Die ziemlich grosse Puppe besteht aus sehr grober brauner Seide und die circuläre Oeffnung befindet sich am Ende eines kurzen Vorbaues und hat einen verdickten glatten Rand, ohne Fransen. Die Anhänge sind auffallend klein und ragen kaum aus der Puppe hervor ; sie tragen ca. 20 Zweige und erinnern in ihrer Form an verzeigte Dornen, da die einzelnen Abschnitte kegelförmig oder pfriemenartig gestaltet und nicht geringelt sind ; sie laufen in feine schwarze Spitzchen aus und sind hänfig, aber nicht immer, mit feinen Wärzchen bedeckt. Die Trichome sind verzweigt und die Puppen sind am Ende

Havia alguns grupos de cazulos em folhas coriaceas que tinham cahido na agua depois de secas.

8. Simulium exigum Lutz.

Comquanto assemelhando-se a varias outras, esta especie parece indubitavelmente boa. Nos maiores exemplares mal atinje 2 milimetros de comprimento, sendo geralmente bastante menor, de modo que figura entre as especies mais exiguas. E' pena que a larva e a pupa não sejam bem conhecidas, o que facilitaria provavelmente muito a discriminação desta especie que parece rara ou de distribuição limitada. Acrecentarei o seguinte á descrição já publicada :

As antenas têm a baze ocracea. As escamas do escudo são de côr de ouro brilhante e carregada, agrupados em feixes e formando estrias ; na parte anterior são mais esbranquiçadas e no escutelo dirijidos transversalmente. O fundo do escudo é geralmente preto aveludado, apenas na marjem posterior ha uma mancha em forma de meia lua com brilho cinzento claro. Ha tambem reflexos prateados no metanoto e na face ventral.

Os halteres têm a haste e o lado externo do capitulo de um ferrujinozo pardo ou acinzentado.

Nas pernas ha escamas espatuladas ou obovais e por isso salientam-se bem, tanto mais, quanto são mais claros do que o fundo.

As unhas parecem inermes.

9. Simulium varians Lutz.

Examinando uma pupa de Petropolis com tubos branquiais muito ramificados como no *S. hirticosta*, achei um mosquito quazi perfeito, com o escudo preto com manchas alaranjadas, que parecia pertencer a esta especie. Nesta as escamas das pernas são tão estreitas que podem ser considegekörnt. (Fig. 35, 36, 39, 40). Sie fanden sich auf dürren lederartigen Blättern, welche in's Wasser gefallen waren.

8. Simulium exigum Lutz.

Obgleich verschiedenen anderen sehr nahestehend, ist diese Art doch zweifellos eine gute. Ihre Länge beträgt auch in den grössten Exemplaren noch nicht zwei Millimeter und ist gewöhnlich wesentlich kleiner, so dass sie den kleinsten Arten beizuzählen ist. Die reife Larve und Puppe, welche wahrscheinlich von denen anderer Arten leicht zu differenzieren wären, sind leider noch nicht sicher bekannt, wie denn die Art überhaupt nicht häufig scheint. Zu der Beschreibung wäre noch Folgendes zu bemerken :

Die Antennen sind an der Basis ockergelb. Die Schuppen am Thorax sind intensiv goldfarben, etwas gebüschelt und in Reihen stehend, vorne sind sie zum Teile weisslich und am Schildchen quergestellt. Vor letzterem ist der Grund am Hinterrande des Scutums in Form eines Halbmondes lebhaft hellgrauschimmernd, statt sammtschwarz. Auch am Metanotum und auf der Unterseite sieht man silberne Reflexe.

Die Halteren sind an Stiel und Aussenseite etwas bräunlich oder graulich rostfarben.

An den Beinen sind die Schuppen spatelförmig, resp. verkehrt eiförmig, und relativ breit, daher deutlich erkennbar, besonders weil sie grösstenteils weit heller, als der Grund, sind.

Die Krallen scheinen keinen Zahn zu haben.

9. Simulium varians Lutz.

Bei der Untersuchung einer, derjenigen von *hirticosta* ähnlichen, Puppe mit vielfach verzweigten Respirationsröhren, fand sich eine fast reife Imago mit orangegelb und schwarz gefleckten Scutum, die wohl nur zu dieser Art gehöhen kann.

Die Schüppchen an den Beinen sind bei dieser Art so schmal, dass man sie als Uebergangsformen bezeichnen kann. Der

radas formas de tranzição. O metatarso do ultimo par tem paleta distinta e o tarso vizinho a incizão habitual.

10. **Simulium paraguayense** SCHROTTKY (?).

Dou em seguida a descrição mais minucioza de uma especie nova que talvez seja identica com o *S. paraguayense* de SCHROTTKY:

Côr geral, enegrecido; tamanho, cerca de 1,5 mm.

Cabeça com fundo escuro e induto nacarado; palpos castanho-escuros, os dous ultimos segmentos com brilho esbranquiçado; antenas na baze de um ocraceo bastante avermelhado, mais para cima enfuscadas com pubecencia quazi branca, o ultimo segmento com ponta um tanto obtuza; marjem orbital com brilho nacarado; olhos chocolate com brilho de ouro ou cobre.

Torax: Escudo preto aveludado, mostrando, já a olho nú, linhas lonjitudinaes paralelas de dourado intenso que o microscopio mostra formadas de escamas lineares estreitas e bastante curtas, grupadas em feixes formando fileiras, e cuja brilho dourado tira para o avermelhado e esverdeado; dos lados, o escudo é tarjado de faxas nacaradas, com brilho azulado e esverdeado que são alargadas no meio; a marjem posterior mostra outra faxa igual, porém coberta de escamas; o escutelo, sem escamas, é preto aveludado. As pleuras e o esterno são pretos com brilho mate.

Abdome preto, com brilho esbranquiçado mate e algumas faxas e manchas mais brilhantes.

Azas iriantes em rozeo, violeta e ouro; a baze enegrecida; as nervuras mais espessas de ocraceo diluido, as outras quazi hialinas; a costa com pelos e espinhos pretos. Halteres de côr amarela, bastante palida.

Pernas: O primeiro par até aos joelhos ocraceo ou pardo-avermelhado; o femur com escamas nacaradas bastante

letzte Metatarsus hat eine deutliche Palette und der benachbarte Tarsus zeigt die gewöhnliche Einkerbung.

10. **Simulium paraguayense** SCHROTTKY (?).

Im Folgenden gebe ich die genauere Beschreibung einer Art, welche ich mit *paraguayense* vom SCHROTTKY für gleichwertig halte:

Länge ca. 1,5 mm., Allgemeinfärbung schwärzlich.

Kopf dunkel, aber mit perlmutterfarbenem Belage, Palpen dunkelbraun, die beiden letzten Segmente weisslich glänzend, Antennen an der Basis stark rötlich ockerfarben, nachher gebräunt, mit weisser Pubescenz, das letzte Segment mit etwas stumpfer Spitze; Orbitalrand perlmutterglänzend; Augen chocoladenbraun mit Gold- oder Kupferglanz.

Thorax: Scutum sammetschwarz mit schon von blossen Auge sichtbaren parallelen Längsstreifen von gesättigter Goldfarbe; unter dem Mikroskope zeigen sie sich aus schmalen und ziemlich kurzen Schuppen bestehend, welche zu, in Reihen stehenden, Büscheln vereinigt sind und deren Goldglanz ins Rötliche und Grünliche spielt; die Seiten des Scutums sind von — in der Mitte verbreiterten — Perlmutterbinden gesäumt, die bläulich und grünlich schillern; eine dritte ähnliche, aber mit goldenen Schuppen bedeckte, Binde steht am Hinterrand des Scutums; das Scutellum ist sammetschwarz und unbeschuppt. Pleuren und Sternum sind schwarz und mattglänzend.

Abdomen schwarz, mit mattem weisslichen Glanze und einigen glänzenderen Binden und Flecken.

Flügel in Rosa, Violett und Gold irisierend; die Basis schwärzlich, die dickeren Adern sehr verwaschen ockerfarben, die feineren fast farblos; die Costa mit schwarzen Dornen und Haaren. Halteren von ziemlich blasser, gelber Farbe.

Beine: Das erste Paar bis zu den Knien braunrötlich oder ockerfarben; der Schenkel mit ziemlich breiten und fast durchsichtigen Perlmutterschuppen; Tibia

largas e quazi transparentes, a tibia um pouco mais clara, mas com apice enegrecido e a face anterior nivea e revestida de escamas nacaradas brancas; o resto da perna preto. Segundo par ocraceo; a extremidade dos ultimos tarsos pardacenta; a tibia com escamas largas, branco-nacaradas e outras mais piliformes; o metatarso com brilho branco. Terceiro par com a coxa preta e o trocanter pardo-ocraceo, o femur na baze como o trocanter, o resto preto; tibia na metade bazal branco-amarelada, na apical ocracea; metatarso ocraceo nos dous terços bazaes, o apice e uma faxa posterior pretos; segundo tarso branco até um pouco além do centro, o resto preto. Unhas com dente pequeno, acima deste uma zona clara com aspecto de outro dente quando visto em perfil.

Esta especie se distingue pelas escamas curtas e brilhantes sobre o fundo preto aveludado do escudo, que, observados ao microscopio, oferecem um aspeto magnifico, e pelas escamas brancas, relativamente curtas e largas, as quaes se destacam distintamente do fundo escuro, principalmente no femur e na tibia do ultimo par de pernas. São todavia muito caducas, podendo faltar em exemplares mal conservados. Mesmo assim a especie pode ser reconhecida pelo tamanho pequeno e o contraste das pernas unicolores e comparativamente claras com o corpo quazi preto.

Tenho a especie de Itapura (Noroeste de S. Paulo), de Alfenas e de Lassance (Sul e Norte de Minas). No ultimo lugar foi apanhada, na tardezinha, em pequeno numero na barriga dos cavalos. Comquanto seja encontrada em bastante extensão, deve ser considerada uma das especies mais raras.

11. S. infuscatum n. sp.

Côr geral enegrecido; comprimento 2—2 $^1/_2$ mm.

Tromba quazi preta, palpos da mesma côr, misturada com um pouco de vermelho, antenas com os tres articulos bazaes etwas heller, aber mit schwärzlicher Spitze und schneeweisser, mit weissen Perlmutterschuppen bekleideter Vorderfläche; der Rest des Beines schwarz. Zweites Paar ockergelb, die Spitze der letzten Tarsen bräunlich, Tibia mit kurzen, aber breiten, perlmutterweissen und anderen mehr haarartigen Schüppchen; Metatarsus mit weissem Glanze. Das dritte Paar mit schwarzer Coxa und bräunlich-ockergelbem Trochanter, Basis des Femur ebenso, der Rest schwarz; Tibia in der basalen Hälfte weisslichgelb, die Spitzenhälfte ockerfarbig; Metatarsus in den zwei basalen Dritteln weisslich, Apex und eine Binde an der Hinterseite schwarz; zweiter Tarsus oben bis etwas über die Mitte weiss, der Rest schwarz. Krallen mit kleinem Zahne, darüber ein breiter heller Saum, im Profil, wie ein zweiter (proximaler) Zahn aussehend.

Diese Art zeichnet sich besonders durch die kurzen und glänzenden Schuppen auf dem sammetschwarzen Grunde des Scutums aus, welche unter dem Mikroskope ein prachtvolles Bild bieten; ferner durch die relativ breiten und kurzen weissen Schüppchen, die sich besonders am letzten Beinpaare auf dem dunklen Grunde von Femur und Tibia deutlich abheben. Doch sind dieselben sehr hinfällig und können bei schlechter Konservation fehlen. Immerhin erkennt man dann die Art an der geringen Grösse und dem Kontrast zwischen den hellen, nahezu einfarbigen Beinen und dem schwärzlichen Leibe.

Ich besitze die Art von Itapura (in Nordwesten von São Paulo), Alfenas und Lassance (Süden und Norden von Minas). An letzterem Orte wurde sie, gegen Abend, ziemlich spärlich am Bauche der Pferde gefangen. Obgleich verbreitet, ist sie doch zu den selteneren Arten zu zählen.

11. S. infuscatum n. sp.

Allgemeinfärbung schwärzlich, Länge 2—2 $^1/_2$ mm.

Rüssel fast schwarz, Palpen ebenso mit etwas Rot gemischt, Antennen an drei Basalgliedern rostrot, der Rest dunkel, aber

ferrujinozos, o resto escuro, mas com pubecencia branca ; o articulo terminal pouco acuminado. Olhos chocolate, o resto da cabeça enegrecido, de pêlos mais claros, aparentemente sem escamas alargadas.

Escudo enegrecido, a marjem posterior com fundo mais claro, brilhante em iluminação lateral ; o tomento é constituido por pêlos achatados ou escamas lineares côr de latão, reunidos em pequenos grupos e formando estrias lonjitudinaes, uma mediana e varias lateraes, diverjindo para traz, onde as escamas se tornam mais claras e transversaes no escutelo. Pleuras e esterno da côr do escudo.

Abdome pardo-amarelado ou preto, distintamente canelado ; os pêlos na marjem posterior do primeiro segmento côr de ouro mate ; outros, mais curtos e escuros, acham-se disseminados sobre a face dorsal dos outros segmentos.

Pernas : o primeiro par até aos joelhos ocraceo pardacento ou avermelhado, mais ou menos enegrecido, com escamas abundantes e distintas de dourado mate ou branco nacarado ; a tibia como as partes superiores, mas com escamas niveas e induto pruinoso da mesma côr na face anterior ; o resto da perna preto com algumas escamas claras no metatarso. Segundo par ocraceo, mas enegrecido em intensidade e extensão variavel, com escamas côr de ouro mate ; quazi toda a tibia e o metatarso, menos o apex, com a face anterior coberta de pruina e escamas brancas ; os tarsos em parte amarelados na baze, no resto enegrecidos ; terceiro par enegrecido, com escamas dourado mate, baze da tibia e do metatarso (menos o apice e uma serie de espinhos pretos, na face posterior) ocracea, com escamas branco-nacarados, o resto preto e com escamas pretas ; unhas com dente bem distinto.

Azas lijeiramente iriantes em verde e vermelho, a baze e as nervuras maiores ocraceo diluido, as outras quazi hialinas. Halteres inteiramente de côr ferrujinoza ou pardo-vermelha, as vezes muito escura.

mit heller Pubescenz, Endglied nicht sehr zugespitzt. Augen chocoladenbraun ; der Rest des Gesichts schwärzlich, mit hellerem Schimmer und Härchen, anscheinend ohne breitere Schüppchen.

Rückenschild schwärzlich, der Hinterrand mit hellerem Grunde und in seitlichem Lichte hell glänzend. Das Toment besteht aus glänzend messinggelben, platten Haaren oder lineären Schüppchen, die zu kleinen Gruppen vereinigt, eine mittlere und zahlreiche, nach hinten divergierende, seitliche Längslinien bilden ; nach hinten zu werden sie etwas heller und sind am Ende des Scutellums etwas quergestellt. Pleuren und Sternum von der Farbe des Scutums.

Abdomen schwarz oder gelbbraun, deutlich in der Längsrichtung geriefelt ; Haare am Rande des ersten Segmentes matt golden, über die anderen zerstreut stehen dorsal kürzere und dunklere Haare.

Beine : erstes Paar bis zu den Knien bräunlich oder rötlich ockerfarben und mehr oder weniger schwärzlich überlaufen, mit reichlichen und deutlichen mattgoldenen oder perlmutterweissen Schüppchen, die Tibia wie oben, aber mit scheneeweissen Schüppchen auf der ebenso bestäubten Vorderfläche ; Rest des Beines schwarz mit einzelnen hellen Schüppchen am Metatarsus. Zweites Paar ockergelb, in wechselnder Intensität und Ausdehnung geschwärzt, mit blassgoldenen Schüppchen, Tibia fast ganz und Metatarsus mit Ausnahme des Apex an der Vorderfläche weiss bestäubt und beschuppt ; die Tarsen teilweise an der Basis gelblich, sonst schwärzlich ; drittes Paar schwärzlich mit mattgoldenen Schüppchen, Basis der Tibia und der Metatarsus (mit Ausnahme des Apex und der schwarzen Dornen an der Hinterfläche) ockerfarben mit perlmutterweissen Schüppchen, der Rest schwarz und zum Teile schwarzbeschuppt. Krallen mit deutlichem Zahn.

Flügel in Grün und Rot leicht irisierend, Basis und grössere Adern verwaschen ockergelb ; das übrige fast farblos. Halteren in toto und oft sehr dunkel bräunlich rot oder rostfarben.

Esta especie parece-se com algumas outras, mas distingue-se facilmente pela combinação de halteres e pernas enfuscadas com escamas bem distintas, revestindo as pernas. Estas escamas são pela maior parte espatuladas, menos vezes obovais ou oblanceoladas, variando em tamanho e largura. Do *S. incrustatum* difere pelo tamanho e a côr das halteres.

A descrição foi feita de exemplares antigos, apanhados na Serra da Bocaina a 1.600 metros de altura. Tenho outros exemplares antigos, indubitavelmente apanhados em gente, do Rio Branco perto de Conceição de Itanhaem no Estado de São Paulo. Encontrei a especie outra vez na Serra da Bocaina, perto de Bonito e em numero um pouco maior, em Caxambú de Cima (Petropolis), ambas as vezes em cavalos. Geralmente aparece apenas em poucos exemplares e deve ser considerada uma das especies raras.

Sobre os primeiros estados não posso referir nada de certo, todavia, por excluzão, tornou-se bastante provavel que algumas pupas, encontradas perto de Bonito, pertençam a esta especie. Rejistrei-as com o nome provizorio *S. diversibranchium* (Fig. 8). O cazulo pertence ao tipo mais comun; a pele da pupa aprezenta na parte anterior pequenos tuberculos escuros e tricomas numerozos, compridos e finos, com, pelo menos dous e geralmente mais, ramos.

O tronco principal dos apendices branquiais se cinde, de cada lado, por dupla bifurcação em quatro tubos, de calibre singularmente dezigual. Os dous exteriores são mais finos e permanecem sem ramificação, dos outros dous o interior é mais grosso reprezentando assim o tronco principal; o segundo é pouco mais grosso que os dous outros aparecendo assim como ramo lateral, embora tenha o mesmo comprimento e se bifurque á mesma altura como o primeiro. Nos ramos tambem se observa a diferença de calibre; pelo resto, são todos subcilindricos, distintamente

Diese Art unterscheidet sich von anderen ähnlichen durch die Kombination von stark gebräunten Beinen und Halteren mit sehr deutlichen Schuppen an den Beinen. Letztere sind zum grössten Teile spatelförmig, seltener oboval oder verkehrt lanzettlich und von wechselnder Länge und Breite. Von *S. incrustatum* unterscheidet sich *infuscatum* durch bedeutendere Grösse und dunklere Halteren.

Die Beschreibung ist nach älteren Exemplaren gemacht, die in der Serra da Bocaina bei 1600 m. gefangen wurden. Ich habe ausserdem ältere Exemplare aus dem Staate São Paulo (Rio Branco bei Conceição de Itanhaem), die zweifellos am Menschen gefangen wurden. Ich fand sie dann ein zweites Mal in der Serra da Bocaina bei Bonito und endlich in etwas grösserer Zahl in Caxambú de Cima bei Petropolis, beide Male an Pferden. Sie gehört zu den selteneren Arten und tritt gewöhnlich nur spärlich auf.

Ueber die ersten Stände kann ich nichts bestimmtes aussagen, doch ist es mir auf dem Wege der Ausschliessung ziemlich wahrscheinlich geworden, dass einige bei Bonito gefundene Puppen hierhergehören. Ich habe diese mit dem provisorischen Namen *S. diversibranchium* bezeichnet (Fig. 8). Das Gespinnnst zeigt den gewöhnlichen Typus; die Puppenhaut ist vorne dunkler chagriniert und hat zahlreiche lange und feine Trichome, die wenigstens zwei-, gewöhnlich mehrgeteilt sind.

Der Hauptstamm der Branchialanhänge zerfällt jederseit durch doppelte Bifurkation in vier Röhren von auffallend ungleichem Kaliber Die beiden äussern sind dünner und bleiben unverzweigt. Von den anderen ist die Innerste auffallend dicker und stellt somit den Hauptstamm dar; die nächste ist wenig dicker, als die beiden andern und erscheint so als ein Seitenzweig, obwohl sie ebenso lang ist, wie die erste und sich mit derselben in gleicher Höhe gabelt. Auch die Zweige lassen noch den Unterschied erkennen; im Uebrigen sind sie alle nahezu cylindrisch

anelados e fechados na extremidade por uma calota subconica.

12. S. subnigrum n. sp.

Côr geral enegrecida; comprimento cerca de 2 $^1/_2$ a 3 mm.

Tromba e palpos enegrecidos, estes ultimos com cinco segmentos; antenas com os segmentos bazaes pardo-amarelados; o resto pardo com pubecencia esbranquiçada, o articulo terminal pouco pontudo; olhos chocolate com reflexos esverdeados e avermelhados; fronte e clipeo com induto prateado, finamente granulozo, sobre fundo escuro e pêlos curtos de côr clara.

Escudo: o fundo escuro com faxa transversal anterior e trez estrias longitudinais, nem sempre distintas, de côr escura; nas marjens lateraes e posterior de côr acinzentada mais clara e com brilho de prata. As escamas piliformes bastante caducas não são dispostas em feixes ou estrias; na parte central do escudo são côr de ouro, sobre o fundo claro das marjens mais palidas, quazi côr de crême; na estremidade do escutelo seguem direção transversal. Pleuras com brilho claro sobre fundo escuro.

Abdome prêto ou pardo-amarelado, em geral distintamente canelado, pelo menos no meio da face ventral; na marjem do primeiro segmento ha pelos claros mais compridos; outros ha, mais curtos, disseminados em grande numero sobre toda a face dorsal.

Pernas: o primeiro par pardo-amarelado até ao apice preto da tibia e, muitas vezes, mais ou menos enegrecido, com escamas piliformes de côr clara; face anterior da tibia com pó e pêlos niveos, o resto da perna preto; segundo par acima do joelho, pardo-ocraceo até quazi preto com escamas de amarelo palido, tibia na metade bazal (mais por diante que por traz) e metatarso nos dois terços superiores com fundo e escamas claras; terceiro par acima do joelho enegrecido, apenas com a baze do femur clara, a haste do mesmo com escamas côr de ouro; tibia na baze até perto do meio de côr clara, com escamas

und deutlich geringelt, am Ende mit einer subkonischen Kalotte abgeschlossen.

12. S. subnigrum n. sp.

Allgemeinfärbung schwärzlich, Länge ca. 2 $^1/_2$—3 mm.

Rüssel und Palpen schwärzlich, letztere fünfgliederig; Antennen an den Basalgliedern bräunlich gelb, der Rest braun mit weisslicher Pubescenz, das Endglied nicht sehr spitzig. Augen chokeladenbraun mit grünlichen und rötlichen Lichtern; Gesicht und Stirne mit silbergrauem, feinkörnigen Belage auf schwarzem Grunde und kurzen hellen Haaren.

Rückenschild: Grund in Farbe und Glanz wie altes Blei, mit vorderer Querlinie und drei, nicht immer deutlichen, dunkleren Längslinien, am Ausser- und Hinterrand heller grau und silberglänzend. Die ziemlich hinfälligen Haarschüppchen sind im Mittelteile länglich, goldglänzend, nicht zu Büscheln oder Reihen geordnet; auf dem helleren Grunde sind sie blasser, fast rahmfarben; am Ende des Schildchens liegen sie quer. Pleuren mit hellerem Schimmer auf dunklem Grunde.

Abdomen schwarz oder gelbbraun, meist, wenigstens in der Mitte der Bauchseite, deutlich längs gefaltet; am Rande des ersten Segmentes längere helle Haare und zahlreichere kürzere über die ganze Rückenfläche zerstreut.

Beine: erstes Paar bis zum schwarzen Apex der Tibia bräunlich ockergelb oder mehr oder weniger schwarz überlaufen, mit hellen Haarschüppchen, Vorderfläche der Tibia schneeweiss bestäubt und behaart, der Rest des Beines schwarz; zweites Paar bis zum Knie gelbbraun bis schwärzlich, mit blassgelben Schuppen; Tibia in der oberen Hälfte (vorne mehr wie hinten) und Metatarsus in den oberen zwei Dritteln hell und hell beschuppt; drittes Paar bis zum Knie schwärzlich, nur die Femurbasis hell, der Schaft mit goldgelben Schüppchen; Tibia oben bis nahezu zur Hälfte hell mit weissen Schüppchen, Metatarsus in den oberen zwei Drittel bräunlich gelb mit weissen Schüppchen; die nächsten Tarsen

brancas ; metatarso nos dois terços superiores pardo-ocraceo com escamas brancas, os tarsos vizinhos com a baze mais clara, o resto enegrecido.

Azas sem particularidades ; halteres com a haste escura e o capitulo variando de amarelo palido até quazi branco.

No macho, os olhos acima parecem castanho-vermelhos, em baixo verdes, com reflexos dourados ; o escudo é preto aveludado, atraz, dos lados e nas partes laterais da marjem anterior com larga tarja nacarada ; as escamas piliformes (não formando feixes nem estrias) com brilho dourado claro sobre o fundo escuro, mais palidas e mates sobre as partes claras, são mais abundantes perto das marjens do que no meio ; nas pleuras, no metanoto e no dorso dos segmentos abdominais 1, 3 e 5 ha manchas de brilho prateado e nacarado que na femea faltam ou são menos brilhantes. As unhas correspondem ao tipo comum dos machos.

Esta especie varia bastante em tamanho e côr sendo isto talvez em parte devido a uma absorção anterior de sangue. Para distinguil-a de outras, mais ou menos similhantes, observe-se principalmente o dezenho e revestimento do escudo e as numerozas escamas claras sobre o fundo escuro das pernas que, pela maior parte, são compridas e estreitas, quazi lineares, e mal se distinguem de formas de tranzição ; ha tambem outras mais curtas, mas nunca são tão largas, que a forma de escamas seja bem evidente. Os mosquitos não perseguem ao homem, mas são apanhados em cavalos com alguma frequencia ; todavia sómente pelo estudo das larvas e pupas se conhece tratar-se de especie muito comum e espalhada. São encontradas, em todas as elevações, em pequenos regatos, frequentemente em companhia do *S. perflavum* e do *S. incrustatum* e se deixam criar com bastante facilidade ; principalmente as pupas não precizam de muito arejamento da agua, de modo que os dous sexos podem ser obtidos com facilidade. Criei-os em São Paulo de larvas dos rios Pacaembú e Anhangabahú e no Rio de pupas de Mendes e

mit etwas hellerer Basis. Das Uebrige schwarz.

Flügel ohne Besonderheiten ; Halterenschaft dunkel, Kapitulum blassgelb bis weiss.

Beim Männchen sind die Augen oben braunrot, unten grünlich, beide Teile mit goldenen Lichtern ; das Scutum ist sammetschwarz, seitlich und hinten mit breitem perlmutterglänzenden Saum, ebenso an den seitlichen Partien des Vorderrandes ; die Haarschüppchen lang, nicht gebüschelt, auf dunklem Grunde hell, goldglänzend, an den hellen Stellen blasser und matter, an den Rändern reichlicher, als in der Mitte ; an den Pleuren, am Metanotum, und dorsal auf dem ersten und dritten bis fünften Abdominalringe finden sich lebhaft silber- oder perlmutterglänzende Flecken, die beim Weibchen weniger ausgesprochen sind oder fehlen. Die Krallen an den Füssen folgen dem gewöhnlichen Typus der Männchen.

Diese Art variiert nicht unerheblich in Grösse und Färbung, was vielleicht zum Teile auf frühere Blutaufnahme zurückzuführen ist. Um sie von zahlreichen, mehr oder weniger ähnlichen zu unterscheiden, beobachte man besonders die Bekleidung und Zeichnung des Scutums und die zahlreichen hellen Schüppchen auf dem dunklen Grunde der Beine, die grossenteils lang und schmal, lineär sind und sich nur schwer von Uebergangsformen unterscheiden lassen ; zwar kommen auch kürzere vor, sie sind aber nie so breit, dass die Schuppenform klar zu Tage tritt. Die Mücken belästigen den Menschen kaum, werden aber nicht selten an Pferden gefangen ; doch erkennt man erst durch das Studium der Larven und Puppen, dass es sich um eine der verbreitesten und gemeinsten Arten handelt. Sie finden sich in allen Höhenlagen in kleinen Bächen, sehr gewöhnlich mit *S. perflavum* und *incrustatum* zusammen und lassen sich verhältnismässig leicht züchten ; namentlich die Puppen stellen an die Durchlüftung des Wassers keine sehr hohen Ansprüche, so das man leicht beide Geschlechter erhalten kann. Ich züchtete sie in S. Paulo aus Larven aus den Bächen Anhangabahú und Pa-

PETROPOLIS, sem que sofressem durante as horas necessarias para o transporte. (Todavia é preferivel conservar os fragmentos vejetais, nos quais se suportam, apenas humidos, e não transportal-as dentro de agua).

O tronco principal dos apendices branquiais de cada lado divide-se em trez ramos, dos quais um se bifurca imediatamente e os dois outros sómente assaz mais para cima, de modo que por algum espaço se vêm quatro ramos grandes, correndo paralelos. Os tubos são terminados em ponta conica que parece sobreposta. A pele da pupa aprezenta granulos finos na parte anterior e tricomas com quatro e mais ramos. Na extremidade posterior existem apenas duas pontinhas não formando ganchos tipicos.

13. S. distinctum n. sp.

Comprimento 3—3 $^1/_2$ mm. Côr geral enegrecida.

Tromba e palpos pardo-escuros, antenas com a baze variando em côr de ocraceo para ferrujinozo e com pubecencia esbranquiçada ; fronte e clipeo pretos, com pruina de brilho prateado, muito claro e intenso, pêlos escuros e escamas piliformes côr de ouro palido ; olhos castanho-vermelhos com reflexos vermelhos e dourados. Occiput sem escamas piliformes, de côr quazi preta, mas com brilho prateado, principalmente nas marjens orbitais.

Escudo côr de chumbo escuro com brilho prateado, bem adiante com estria transversal escura, sem brilho ; trez outras lonjitudinais (uma mediana e duas laterais) da mesma côr são muitas vezes pouco distintos, com exceção da parte anterior, e cobertas pelo tomento, quando está bem conservado ; este é formado por escamas piliformes lineares, de tamanho medio e de côr dourada, sem agrupamento especial, que se tornam mais compridos na parte posterior ; seguem uma direção lonjitudinal, exceto no escutelo onde são transversais. Pleuras, esterno, pro- e metatorax escuros com reflexo claro que, principal-

CAEMBÚ, in RIO, aus solchen von MENDES und PETROPOLIS, wobei sie den mehrstündigen Transport ganz gut ertrugen. (Es ist jedoch besser die besetzten Pflanzenteile nur feucht zu halten, als sie in Wasser zu transportieren).

Der Hauptstamm der jederseitigen Atmungsanhänge zerfällt in drei Aeste, von denen sich einer sofort gabelt, so dass eine Strecke weit vier grössere Aeste nebeneinander verlaufen, indem sich die beiden andern erst weiter oben, nahe bei einander, teilen. Die Zweige haben am Ende eine aufgesetzte kegelförmige Spitze. Die Puppenhaut ist vorne fein chagriniert und weist vier- und mehrteilige Trichome auf. Am Hinterende der Puppe finden sich nur zwei Spitzchen, keine deutliche Häkchen.

13. S. distinctum n. sp.

Länge 3—3 $^1/_2$ mm., Allgemeinfärbung schwärzlich.

Rüssel und Pappen dunkelbraun, Antennen mit ockergelber bis rostroter Basis und heller Pubescenz ; Stirne und Clypeus schwarz mit feinem, stark silberweissem Reif, dunklen Haaren und blassgoldenen Haarschüppchen. Augen braun. Hinterkopf schwärzlich, mit silbernem Schimmer, besonders an den Augenrändern, aber ohne Haarschüppchen.

Scutum dunkel bleigrau mit hellerem Schimmer ; ganz vorne ein dunkler, nicht glänzender Querstreifen, ein ebensolcher mittlerer und zwei seitliche Längsstreifen sind nicht immer deutlich und meist nur vorne sichtbar ; wenn das Toment gut erhalten ist, bedeckt es diese Zeichnungen ; es besteht aus mässig langen lineären, goldfarbenen Haarschüppchen ohne besondere Anordnung, die nach hinten zu länger werden ; am Scutellum sind sie längs, sonst quer gerichtet. Pleuren, Sternum, Pro- und Metathorax dunkel mit hellerem Schimmer, der besonders an den Schulterhöckern und den Pleuren lebhaft silberweiss glänzen kann.

Abdomen oben dunkel, mit zahlreichen Härchen von dunkler Farbe und goldnem

mente no protorax e nas pleuras, pode assumir um brilho prateado intenso e claro.

Abdome em cima escuro, com numerozos pêlos miudos de côr escura e brilho claro; na parte ventral e, muitas vezes, já dos lados, as marjens posteriores dos segmentos aparecem côr de cera amarela clara, em extensão variavel, podendo ás vezes ocupar quazi toda a face ventral; ha tambem uma canelação muito acuzada. No dorso do segundo segmento ha de cada lado uma mancha brilhante de prateado claro.

Pernas: no par anterior os pés são pretos, o resto ocraceo com pó e escamas piliformes douradas; só a face anterior das tibias aprezenta pó e escamas piliformes brancos; tambem o metatarso do segundo par tem a baze até alem do meio de amarelo claro e as bazes dos tarsos vizinhos aprezentam coloração igual; no terceiro par o femur é amarelo, ás vezes com o apice enegrecido; a baze da tibia até perto do meio é de ocraceo claro; o metatarso, com exceção do quarto apical, é quazi branco, mas revestido de escamas piliformes douradas; a baze do tarso vizinho é amarelada e o resto pardo-escuro até preto; a palheta do metatarso e a incizura do tarso vizinho são bem evidentes; as unhas têm um dente bem distinto e acima d'este um angulo saliente.

Azas com a baze e as nervuras mais grossas de pardo-amarelado diluido; halteres com o capitulo amarelo e a haste cinzenta ou avermelhada, côres, que se podem estender, ás vezes, um tanto sobre o proprio capitulo.

A especie se parece extraordinariamente com o *S. pertinax*, mas é muito maior e mais grossa; ao contrario desta é encontrada de preferencia em elevações maiores e não ataca o homem. Nos cavalos costuma procurar a crina.

Apanhei muitos exemplares na serra da Bocaina e em Caxambú de Cima perto de Petropolis e recebi outros de Juiz de Fora.

Nos mesmos lugares e junto com a especie acima descrita encontram-se, com

Glanze. Auf der Unterseite und manchmal schon an den Seiten sind die Hinterränder in wechselnder Breite wachsgelb, manchmal erscheint der grösste Teil der Ventralfläche so; ausserdem ist eine sehr starke Riefelung vorhanden. Auf dem zweiten Segmente oben jederseits ein silberweisser, glänzender Fleck.

Beine: an den vorderen Paaren sind die Füsse schwarz und die Beine ockergelb mit goldglänzenden Haarschüppchen und ebensolcher Bestäubung; nur die Vorderfläche der Tibien mit weissen Haarschüppchen und weissbestäubt; ferner ist am mittleren Paare der Metatarsus oben bis über die Hälfte hellgelb und ebenso die Basis der nächsten Tarsen. Am dritten Paare ist der Femur gelb, die Spitze manchmal etwas schwärzlich; die Tibia oben bis nahe an die Mitte hell ockergelb, der Metatarsus weisslich mit goldenen Haarschüppchen mit Ausnahme des Apex (ca. 1/4), ferner die Basis des nächsten Tarsus gelblich, der Rest dunkelbraun bis schwarz, Palette des Metatarsus und Incisur des nächsten Tarsus deutlich, Krallen mit deutlichem Zahne und vorspringender Ecke.

Flügel: Basis und stärkere Adern verwaschen gelbbraun; Halteren mit gelbem Kapitulum, Schaft grau- oder rötlich, was manchmal etwas auf das Köpfchen übergreift.

Die Art gleicht *S. pertinax* ungemein, ist aber bedeutend grösser und dicker; im Gegensatz zu diesem findet sie sich besonders in höheren Lagen und greift auch den Menschen nicht an. Bei den Pferden sucht sie meist die Mähne auf.

Ich fing zahlreiche Exemplare in der Serra da Bocaina und in Caxambú de Cima bei Petropolis; auch von Juiz de Fóra habe ich sie erhalten.

An den selben Lokalitäten, wie die oben beschriebene Art, finden sich ziemlich häufig Individuen, die in Grösse, Form, Krallenbildung und vielen Details der Zeichnung die grösste Uebereinstimmung zeigen. So haben sie denselben stark sil-

bastante frequencia, simúlidas adultos, mostrando analojia completa em tamanho, forma, morfolojia das unhas e muitos pormenores de dezenho e coloração. Assim têm o mesmo induto pruinozo, com brilho de prata, na cabeça e nas pleuras e mostram, como estes, reflexos dourados e prateados nas pernas. Mesmo a côr clara, observada de lado e em baixo dos segmentos abdominais, pode ser encontrada nestes individuos, embora menos accuzada. Do outro lado observam-se diferenças de côr nas pernas e nos halteres, que me levaram, a principio, a distinguir mais duas especies. Todavia, o exame de grande numero de exemplares mostra muitas formas de tranzição e não permite estabelecer limites certos. Nas pernas, as partes claras acima do joelho aparecem de côr ferrujinoza até castanho-avermelhado. Isto se dá principalmente com o femur do ultimo par, mas pode estender-se sobre os outros pares. Os halteres podem ser um pouco ferrujinozos não sómente do lado externo, mas tambem por dentro, e, em alguns cazos, o capitulo e a haste mostram tambem uma côr vermelha-pardacenta igual ; nestes cazos, a imtensidade de coloração das pernas e a dos halteres não estam sempre de acordo. Por ora não se pode determinar quanto é devido a variações individuais e quanto a alimentação influe, por tinção da massa de sangue. E' tambem possivel que haja certa influencia de temperatura e em consequencia disso de elevação vertical, como acontece tambem em outros insetos.

14. Simulium incrustatum n. sp.

Tamanho, cerca de 2—3 mm. ; côr geral preta.

Macho : Antenas inteiramente de côr chocolate escura com pouca pubecencia esbranquiçada, apenas o tóro avermelhado ; palpos da mesma côr chocolate, como tambem a tromba e a face ; esta ultima com alguns pêlos dourados ; olhos confluentes e muito grandes, na parte de cima, com as grandes facetas, de côr chocolate,

berglänzenden Reif am Kopf und den Pleuren und dieselben Perlmutterflecke am zweiten Abdominalring und zeigen auch an den Beinen, wie diese, silberne und goldene Reflexe. Selbst die helle Färbung, welche bei den Abdominalsegmenten seitwärts und unten vorkömmt, wird bei den zu beschreibenden Individuen zuweilen, wenn auch seltener, beobachtet. Dagegen finden sich in der Färbung der Beine und Halteren Unterschiede, welche mich ursprünglich zur Aufstellung zweier anderer Arten veranlassten ; doch zeigt die Untersuchung eines grossen Materiales zahlreiche Uebergänge und erlaubt mir nicht, scharfe Grenzen zu ziehen. An den Beinen erscheinen die hellen Teile oberhalb des Knies roströtlich bis braunrot. Besonders ist dies am letzten Schenkel der Fall, doch kann es sich auch über alle Beine erstrecken. Die Halteren können nur an der Aussenseite des Kapitulums, aber auch innen roströtlich angelaufen sein ; in einzelnen Fällen erscheint Schaft und Köpfchen gleichmässig intensiv bräunlichrot gefärbt,, wobei die Färbung des Kapitulums nicht immer derjenigen der Beine entsprechend dunkel ist. Wie weit die individuelle Variation geht und wie weit die Ernährung (durch Färbung der Blutmasse) wirkt, lässt sich vorderhand nicht entscheiden. Es wäre auch möglich, dass die Temperatur und in Verbindung damit die vertikale Erhebung einen Einfluss haben könnten, wie dies auch bei anderen Insekten vorkömmt.

14. Simulium incrustatum n. sp.

Grösse : ca. 2—3 mm., Allgemeinfärbung schwarz.

Männchen : Antennen ganz chocoladenbraun mit geringer weisslicher Pubescenz, nur der Torus rötlich ; Palpen, Rüssel und Gesicht von derselben braunen Farbe, letzteres auch mit einigen goldenen Haaren ; Augen zusammentossend und sehr gross ; der obere Teil mit chocoladenbraunen,

na de baixo, de facetas pequenas, e com brilho verde-dourado; o occiput parece escuro.

Torax, em cima, de preto aveludado, menos nos lugares seguintes: duas estrias em forma de virgula ou cuneiformes, partindo da marjem anterior, a distancia quazi egual das marjens laterais e da linha mediana e correspondendo ao terço do comprimento do escudo, duas faxas largas tarjando os lados do escudo e outra ocupando a marjem posterior adiante do escutelo; aqui, o fundo tem a côr de chumbo velho com lijeiro brilho nacarado. Ha escamas curtas, estreitas e pouco densas de uma côr de latão bastante brilhante que se tornam mais compridas por cima da faxa posterior e no escutelo têm direção transversal; as pleuras e a face inferior do torax têm o fundo parecido com o das faxas descritas, mas menos brilhante.

Abdome preto, do quinto anel para traz com algumas manchas prateadas dos lados e em baixo, uma mancha branca de cada lado do segundo segmento e uma franja de pêlos escuros e bastante compridos na marjem posterior do primeiro anel.

Azas iriantes em vermelho, alaranjado e amarelo, as nervuras grossas amarelo dourado, as finas quazi sem côr, a baze pardacenta de pêlos da mesma côr; halteres com o capitulo de côr de canario (do reino), assaz brilhante.

Pernas: primeiro par ocraceo, mais ou menos enegrecido, até aos joelhos, as tibias pretas com a face anterior clara; o resto, completamente preto; na coxa e no femur ha pêlos compridos escuros e escamas douradas obovais, compridas, muito conspicuas; na tibia ha outras, de côr branca, como o fundo; segundo par na sua totalidade pardacento, na coxa com muitas escamas douradas e algumas mais claras, o pé quazi preto; terceiro par pardo-acinzentado até ao apice da tibia, com pêlos bastante compridos; o metatarso é branco, menos nas extremidades e na face posterior que são pretas; o resto do pé é preto; as unhas têm a forma do costume.

grossen, der untere mit goldgrünglänzenden kleinen Facetten; der Hinterkopf anscheinend dunkel.

Thorax oben sammtschwarz mit Ausnahme folgender Stellen: zwei keil-, komma- oder nierenförmige Striemen, die am Vorderrande, ziemlich gleichweit von Mittellinie und Seitenrändern, entspringen und an Länge dem Drittel des Scutums entsprechen; zwei breite Streifen, welche die Seiteränder säumen und ein dritter der den Hinterrand vor dem Scutellum einnimmt; hier hat der Grund die Färbung alten Bleis, mit leichtem Perlmutterglanz. Auf dem Scutum stehen schmale, kurze und wenig dichte Haarschüppchen von ziemlich glänzender Messingfarbe, welche über der hinteren Binde länger werden und am Schildchen eine quere Lagerung zeigen; Pleuren und Unterseite des Thorax gleichen in der Farbe des Grundes den oben beschriebenen Streifen, sind aber weniger glänzend.

Abdomen schwarz, vom fünften Ringe an auf der Seite und unten mit einigen sibernen Flecken, am zweiten Segmente beiderseits ein weisser Fleck, das erste Segment am Hinterrande mit Fransen von dunklen und ziemlich langen Haaren.

Flügel in Rot, Orange und Gelb schillernd; die dicken Adern goldgelb, die dünneren fast farblos; die Basis bräunlich mit ebensolchen Haaren; Halteren am Kapitulum ziemlich glänzend kanariengelb.

Beine: das erste Paar bis zu den Knien ockergelb und mehr oder weniger schwärzlich überlaufen, die Schienen schwarz mit heller Vorderseite, der Rest des Beines ganz schwarz; an Hüfte und Schenkel lange Haare und obvovale, längs gestreckte, sehr auffallende goldene Schuppen, auf dem hellen Grunde der Tibia ebensolche weisse; das zweite Paar im Ganzen bräunlich, an der Coxa viele goldene und einige hellere Schuppen; der Fuss fast schwarz; das dritte Paar mehr

A femea tem os trez primeiros articulos das antenas avermelhados ; a côr das pernas varía, podendo sêr mais clara ou mais escura, geralmente, porém, parece-se com a descrição acima, mostrando distintamente as escamas.

Os pêlos no primeiro anel abdominal e na perna de traz são mais curtos do que no macho, o lado inferior do abdome é distintamente canelado em baixo e as unhas têm um dente pequeno.

A larva, de côr encarnada diluida, é bastante pequena ; transforma-se em pupa muito pequena com tubos branquiais compridos e finos terminados por ponta subconica. Logo na baze nacem tres troncos por duas divizões sucessivas, bifurcando-sé sómente muito mais acima, primeiro o impar e depois os dois pares. Os tricomas são simples ou bifidos, a pele.

As larvas e pupas, mais raramente o mosquito perfeito, foram obtidos em muitos lugares, por exemplo em Petropolis, Mendes e na Serra da Bocaina, em São Paulo (Rios Pacaembú e Anhangabahú) : o mosquito foi tambem colecionado em Alfenas pelo Dr. Gurgel do Amaral e no interior de Pernambuco pelo Dr. David Madeira. Ataca aos cavalos mas não persegue o homem.

15. S. auristriatum n. sp.

Comprimento 2—2 $^1/_2$ mm. ; côr geral enegrecida.

Palpos e proboscida enfuscados, antenas enegrecidas, com os articulos bazais ferujinozos e pubecencia branca, o ultimo segmento pontudo. O fundo da cabeça côr de chumbo escuro com brilho mais claro, fronte e clipeo com alguns pelos mais claros ; os olhos parecem verdes, com brilho dourado e avermelhado, a sua marjem posterior com brilho de prata.

Escudo preto aveludado com cinco estrias lonjitudinais finas, porém bem definidas, com brilho de ouro um tanto esverdeado, ao lado dos quais ha outras menos distintas e diverjindo para traz ; debaixo

graulich und langebehaart bis zum Ende der Tibia ; der Metatarsus weiss, ausgenommen an den Enden und der Hinterfläche, welche schwarz sind ; der übrige Fuss ist schwarz. Die Krallen wie gewöhnlich bei den Männchen.

Beim Weibchen sind die drei ersten Antennenglieder rötlich ; die Farbe der Beine wechselt in heller und dunkler, gleicht aber gewöhnlich der beim Männchen beschriebenen ; die Schüppchen sind deutlich sichtbar.

Die Haare am ersten Hinterleibsringe und am letzten Beinpaare sind kürzer, als beim Männchen ; der Hinterleib ist unten deutlich canneliert und die Krallen haben einen kleinen Zahn.

Die Larve ist rötlich ; sie verwandelt sich in eine sehr kleine Puppe mit langen und dünnen, subkonisch endenden Respirationsröhren. Gleich an der Basis bilden sich durch doppelte Gabelung drei Stämme, die sich erst viel weiter oben spalten und zwar zuerst der einzelne und nachher die beiden paarigen. Die Puppenhaut ist teils, die Trichome einfach oder zweiteilig.

Ich habe Larven und Puppen, seltener Imagines dieser Art von verschiedenen Orten, teils erhalten, teils selbst gesammelt, Z. B. Serra da Bocaina, S. Paulo (Pacaembú und Anhangabahú) ; auch aus dem Innern von Pernambuco erhielt ich sie durch Dr. Madeira.

15. S. auristriatum n. sp.

Länge ca. 2—2 $^1/_2$ mm. ; Allgemeinfärbung schwärzlich.

Palpen und Rüssel braun, Antennen schwärzlich mit weisser Pubescenz und rostroter Basis ; das Endglied zugespitzt. Der Grund des Kopfes dunkel bleigrau mit hellen Schimmer ; auf Stirn und Clypeus einige hellere Härchen ; Augen anscheinend grün, mit rotgoldenem Glanze, der Hinterrand derselben silberschimmernd.

Scutum sammetschwarz, makroskopisch mit fünf schmalen, aber deutlichen, grüngoldenen Längsstreifen ; seitlich von diesen stehen einige weniger deutliche, nach hinten divergierende. Dieselben bestehen, wie das Mikroskop zeigt, aus in Reihen stehen-

do microscopio aparecem formadas de escamulas lineares, curtas, mas relativamente largas, com magnifico brilho de ouro, grupados em feixes e estrias. Marjens laterais e posterior do escudo e escutelo com brilho claro; o resto do torax côr de chumbo escuro com brilho claro.

Abdome anelado e canelado, de côr enegrecida até preta aveludada, com reflexos claros e manchas laterais nacaradas na face dorsal de alguns segmentos.

Pernas, na sua maior parte de ocraceo pardacento ou avermelhado, tibia do primeiro por com apice escuro, o resto com pó, pêlos e escamas brancos; o pé preto; no segundo par o pé é mais esbranquiçado e o apice dos articulos mais escuro; no terceiro par o femur é preto nos dous terços apicais; a tibia na baze até perto do meio, metatarso no dous terços bazais e o tarso vizinho na metade bazal brancos, o resto da tibia e do pé enfuscado até preto. Unhas com dente fino e angulo proeminente, imitando um segundo dente. A formação do ultimo pé corresponde ao tipo de *eusimulium*. Esta especie aprezenta em todas as pernas escamas petaloides abundantes, espatuladas ou obovais, comparativamente curtas e largas e extremamente finas. A sua côr é sempre clara, nas partes brancas de branco nacarado, nas outras pela maior parte de dourado mate, sendo assim facilmente percebidos sobre o fundo escuro, não obstante a sua pouca grossura. Por outro lado pouco aparecem na preparação microscopica.

Azas fortemente iriantes; halteres com haste escura, piloza e o capitulo ora palido, ora de amarelo vivo e as vezes lijeiramente avermelhado.

Exemplares bem conservados desta especie conhecem-se facilmente, já pelo tomento do escudo. Recebi alguns de Juiz de Fora e Alfenas e observei outros na Serra da Bocaina, onde atacavam os cavalos e raramente as pessoas. Trata-se de especie espalhada, mas bastante rara.

den kleinen Büsscheln kurzer, aber relativ breiter, linearer Schüppchen von prachtvollem Goldglanze. Hinterrand und Seitenrand des Scutums, wie des Scutellums, mit hellem Glanze. Der Rest des Thorax dunkel bleifarben, weissglänzend.

Hinterleib geringelt und geriefelt, schwärzlich bis sammetschwarz, mit hellen Reflexen und perlmutterglänzenden seitlichen Flecken auf der Oberseite mehrerer Segmente.

Beine: zum grössten Teile bräunlich oder rötlich ockergelb; vorderste Tibia mit dunklem Apex, der Rest weiss bestäubt, behaart und beschuppt, der Fuss schwarz; am zweiten is der Fuss mehr weisslich, und der Apex der einzelnen Abschnitte dunkler; am dritten Paare die unteren zwei Drittel des Femur schwarz; Basis der Tibia bis fast zur Mitte, obere zwei Drittel des Metatarsus und obere Hälfte des nächsten Tarsus weis, der Rest der Tibia und des Fusses dunkelbraun bis schwarz. Krallen mit feinem Zahn und vorspringender Ecke, die wie ein zweiter Zahn aussehen kann. Die Bildung des letzten Fusses entspricht dem *Eusimuliumtypus*. Bei dieser Art finden sich an allen Beinen reichlich petaloide Schüppchen. Dieselben sind verhältnismässig kurz und breit, spatelförmig oder oboval und äusserst fein. Ihre Farbe ist immer hell, an den weissen Stellen perlmutterweiss, an den anderen Stellen grösstenteils mattgolden, so dass sie auf dunkler Unterlage trotz ihrer Zartheit leicht zu erkennen sind. Dagegen sind sie im mikroskopischen Präparat leicht zu übersehen.

Flügel lebhaft irisierend; Halteren mit dunklem behaartem Stiel und bald blass, bald lebhaft gelbem Köpfchen, das aussen leicht rötlich angehaucht sein kann.

Gut erhaltene Exemplare dieser Art sind schon durch das Toment des Scutums leicht zu erkennen. Ich erhielt solche von Juiz de Fora und Alfenas und beobachtete eine Anzahl von Exemplaren in der Serra da Bocaina, wo sie meist Pferde, seltener Menschen angriffen. Es handelt sich um eine zwar verbreitete, aber doch ziemlich seltene Art.

16. S. subpallidum n. sp.

Côr geral, pardacenta; comprimento, ca. de 2 mm.

Tromba castanha, palpos ocraceos na baze, depois castanhos, de pêlos claros e escuros, antenas ocraceas, mais claras na baze, mais escuras em direção ao apice, com pubecencia esbranquiçada; clipeo, fronte e occiput com induto finamente granulozo, de brilho branco, e pêlos curtos quazi brancos.

Escudo com fundo escuro, coberto de induto pruinozo acinzentado e escamas piliformes douradas, muito palidas, estreitas e compridas, em distribuição uniforme; o fundo escuro aparece em forma de trez faxas lonjitudinais bastante irregulares; as pleuras e o esterno de côr prateada mate; escutelo, destacando-se pela côr ocracea, lijeiramente enegrecida. Metanoto preto com brilho branco.

Abdome ocraceo, um pouco enegrecido do terceiro segmento para traz, ficando porém as marjens dos aneis mais claras em cima; no terceiro, quarto, e quinto segmento ha manchas dorso-laterais quadrangulares, de preto aveludado.

Pernas: o primeiro par, acima do apice da tibia, ocraceo claro, um pouco enfuscado, principalmente do lado dorsal, com escamas lineares esbranquiçadas; face anterior da tibia com fundo brilhante branco, o resto da perna enegrecido; segundo par, ocraceo com escamas esbranquiçadas; na tibia e no metatarso o fundo com pó e escamas brancas, apice do metatarso e resto do pé enegrecido, apenas a baze dos tarsos um pouco mais clara: terceiro par ocraceo acima do apice enegrecido do femur, tibia com os trez quintos de cima ocraceos, o resto enegrecido, em extensão maior por diante do que na face posterior; metatarso com o quarto apical preto, o resto branco pruinozo; a baze do tarso seguinte bastante clara, o resto do pé, preto. Unhas aparentemente sem dente.

Azas: a baze de ocraceo diluido; nervuras mais grossas tambem, mas em parte com pequenos espinhos pretos. Halteres: a haste enfuscada na baze, amare-

16. Simulium subpallidum n. sp.

Allgemeine Färbung bräunlich, Länge ca. 2 mm.

Rüssel braun, Palpen an der Basis ockerfarben, weiter oben braun mit dunkleren und helleren Haaren, Antennen ockerfarben, an der Basis heller, nach der Spitze zu dunkler, mit weisslicher Pubescenz; Clypeus, Stirne und Hinterkopf mit weissglänzendem, feinkörnigem Belage und kurzen, fast weissen Haaren.

Scutum mit dunklem, grau bereiftem Grunde und gleichmässig verteilten, schmalen und langen Haarschüppchen von ungewöhnlich heller Goldfarbe; der dunkle Grund erscheint in Gestalt dreier ziemlich unregelmässiger Striemen; Pleuren und Sternum von matter Silberfarbe, Scutellum auffallend hell, ockerbräunlich. Metanotum schwarz mit weissem Schimmer.

Abdomen ockerfarben, vom dritten Segmente an schwärzlich, nur die Ränder der Ringe oben heller; auf dem dritten vierten und fünften Segmente dorsal und seitlich viereckige Flecke von sammtschwarzer Färbung.

Beine: Das erste Paar bis zum Apex der Tibia ockergelb und, besonders oben, etwas gebräunt, mit lineären weisslichen Schuppen, Vorderfläche der Tibia mit glänzend weissem Grunde, Rest des Beines schwärzlich; zweites Paar ockergelb, mit weisslichen Schuppen, Tibia und Metatarsus weiss bereift und beschuppt, Apex des Metatarsus schwarz, wie der Rest des Beines, nur die Basis der Tarsen heller; drittes Paar bis zum schwärzlichen Femurapex ockergelb, obere drei Fünftel der Tibia ebenso, der Rest schwärzlich (vorne in grösserer Ausdehnung, als hinten). Metatarsus weiss bereift, das letzte Viertel schwarz, ebenso der Rest des Fusses mit Ausnahme der etwas helleren Basis des nächsten Tarsus. Krallen ancheinend ungezähnt.

Fügel: Basis und dickere Adern ziemlich verwaschen ockergelb, die letzteren jedoch zum Teil mit schwarzen Dörnchen. Halteren: Basis des Stieles bräunlich, der Rest gelb; Kapitulum kanariengelb.

lada no resto; capitulo amarelo de canario do reino.

A descrição refere-se a dous exemplares (um dos quais repleto de sangue), apanhados n'um cavalo perto de Benjamin Constant (no estado de Minas).

A especie é bem caraterizada pela côr clara que aparece principalmente no escutelo e na baze do abdome, como tambem pelo revestimento do escudo, mesmo quando as manchas no dorso abdominal não são viziveis. As escamas das pernas nunca são largas, mas, pelo contrario, estreitas e lineares, ou mesmo formas de tranzição.

De pupas vindas de Anhemby no Tiété e de Lassance (Fig 13), com os tubos branquiais muito exquizitos, extrahi adultos que por todos os seus carateres pareciam pertencer a esta especie. N'estas nacem de baze comum quatro troncos principais, dos quais dois, situados mais por fóra e por dentro, se bifurcam mais acima; dos intermediarios um permanece inteiro, emitindo o outro em alturas diferentes dois galhos laterais. O primeiro pode tambem ser considerado como outro galho lateral do segundo. Todos os ramos são largos na baze e pontudos na extremidade, sendo assim mais conicos, do que cilindricos; as pontas subconicas não são igualmente distantes da baze e os tubos não são distintamente anelados, de modo que todo o apendice lembra um pouco os galhos de veado. Os tricomas são ramificados e o cazulo pertence ao tipo vulgar. As larvas não têm nada de caraterístico.

17. S. flavopubescens n. sp.

De côr geral preta, com abundante pubecencia amarela e cerca de 3 mm. de comprimento.

Cabeça com fundo preto e lijeiro brilho cinzento; fronte e clipeo, de pêlos negros e escamas lineares de amarelo dourado; tromba, palpos e antenas enegrecidos, os dois ultimos com a baze pardo-ocracea e as antenas com pubecencia curta, acinzentada, occiput com escamas lineares de

Beschreibung nach zwei Exemplaren, welche in Benjamin Constant (Minas) an einem Pferde von mir gefangen wurden.

Die Art ist durch ihre helle Farbe, die besonders am Scutellum und der Basis abdominis auffällt, sowie die Bekleidung des Torax genügend charakterisiert, selbst wenn die Flecken am dorsum abdominis nicht erkennbar wären. Die Schuppen der Beine sind nie breit; es handelt sich vielmehr um wening deutliche, schmale, lineäre oder Uebergangsformen.

Aus Puppen von Anhemby am Tiété und anderen aus Lassance (Fig. 13), mit sehr auffälligen Branchialanhängen habe ich Imagines gewonnen, welche soweit erkennbar, hierher zu gehören schienen. Aus gemeinsamer Basis entspringen vier Stämme, von denen der äusserste und innerste sich etwas weiter oben gabeln; von den mittleren bleibt einer ganz, der andere zeigt auf verschiedener Höhe zwei Seitensprossen. Der ungeteilte kann auch als niedrigste Sprosse des mehrfach geteilten aufgefasst werden. Alle Aeste sind an der Basis breit, oben spitz, daher mehr konisch, als cylindrisch; sie enden subkonisch in verschiedener Entfernung von der Basis und sind nicht sehr deutlich geringelt, so dass die Anhänge etwas an ein Hirschgeweil eriunern.

Larven ohne Besonderheiten. Trichome verzweigt. Gespinnst wie gewöhnlich.

17. S. flavopubescens n. sp.

Allgemeinfärbung schwarz mit reichlicher gelber Pubescenz; Grösse ca. 3 mm.

Grund des Kopfes schwarz, leicht grauschimmernd; Stirne und Clypeus mit dunklen Haaren und goldgelben lineären Schüppchen; Rüssel, Palpen und Antennen schwarz, die beiden letzten mit gelbbrauner Basis. die Antennen mit kurzer hellgrauer Pubescenz; Occiput mit lineären goldgelben Schuppen, auf den Seiten mit längeren dunklen Haaren.

amarelo dourado e, dos lados, com pêlos maiores de côr preta.

Escudo de côr preto-ferrujinoza, densamente coberto com escamas piliformes, estreitas e relativamente curtas, de amarelo dourado; no escutelo são mais curtas, seguindo direção transversal, e a marjem deste mostra pelos pretos; pleuras e esterno enegrecidos, com fraco brilho claro.

Abdome enegrecido, na rejião dorsal com abundantes escamas estreitas e lineares, como na parte posterior do escudo.

Pernas inteiramente de côr chocolate escura, de pêlos escuros e finos e escamas lineares douradas, principalmente no femur e na tibia do ultimo par; metatarso deste com palheta bastante dezenvolvida, o tarso seguinte um pouco alongado, com incizura dorsal pouco profunda; unhas com dente bem dezenvolvido.

Azas com a baze e as nervuras grossas pardo-escuras e pêlos com brilho de ouro na baze. Halteres com o capitulo quazi preto e a haste bastante clara, um pouco pardacenta.

Esta especie é bem caraterizada pela côr geral escura e pela pubecencia dourada, formada por escamas lineares ou piliformes. Não ha escamas petaloides.

Apanhei duas femeas em cavalos e mais um no ato de picar-me; os primeiros no alto do Itatiaia n'uma elevação de pelo menos 2400 m. e o terceiro ainda alguns centos de metros mais acima, na baze das Agulhas Negras.

Encontrei as larvas e pupas com alguma frequencia, no mesmo lugar no alto do Itatiaia. Parecem-se com as do *S. pernigrum*, mas a pupa só tem 12 tubos branquiais de cada lado, rezultando da ramificação de seis troncos maiores. Tem tricomas ramificados e a pele da parte anterior é semeada de granulos escuros. Ha um cazulo distinto, porém muito fino e, geralmente, encoberto de algas.

Estes estados foram encontrados nas folhas de uma especie de *Isoëtes* que crecia n'um corrego bastante fundo e com agua muito fria.

Scutum rötlich schwarz, dicht bedeckt von schmalen und ziemlich kurzen, goldgelben Haarschüppchen, die am Schildchen länger werden und quer liegen. Der Rand des letzteren mit schwarzen Haaren; Pleuren und Sternum schwarz mit mattem, hellerem Schimmer.

Abdomen schwärzlich, auf der Oberseite mit vielen schmalen lineären Schüppchen, ähnlich denen am Hinterrand des Scutums.

Beine durchwegs dunkel chokoladenfarben, mit dunklen Haaren und goldgelben lineären Schuppen, besonders an Femur und Tibia des letzten Paares; der Metatarsus desselben mit ziemlich entwickelter Palette, der nächste Tarsus etwas verlängert mit wenig tiefer dorsaler Incisur, Krallen mit gut ausgebildetem Zahn.

Flügel: dickere Adern und Basis braun, letztere mit goldschimmernden Haaren; Halteren mit fast schwarzem Kapitulum und ziemlich hellem, leicht bräunlichem Stiel.

Die Art ist leicht erkennbar durch die Kombination von schwarzer Farbe mit goldgelber Pubescenz, die auch auf dem Dorsum abdominis deutlich ist und aus lineären Haarschüppchen besteht; breitere Schuppen kommen nicht vor.

Zwei Weibchen dieser Art wurden auf der Hochebene des Itatiaya bei wenigstens 2400 M. über dem Meer an Pferden gefangen, noch einige Hundert Meter höher ein drittes am Fusse des Gipfels (Agulhas negras), während es mich zu stechen suchte.

In derselben Gegend fand ich die zugehörigen Larven und Puppen ziemlich reichlich im sehr kalten Wasser eines Bergbaches, zum Teil an einer Art von *Isoëtes*. Sie gleichen vollständig denen von Simulium montanum, aber die Nymphe hat jederseits nur 12 Verzweigungen, die aus der Gabelung von sechs grösseren Aesten entstehen. Trichome verzweigt. Puppenhaut vorne dunkler chagriniert.

Es findet sich ein deutliches, aber dünnes Gespinnst, das vielfach mit Algen verfilzt ist.

18. S. pruinosum n. sp.

Côr geral enegrecida ; comprimento cerca de 3 mm. (Fig. 42).

Tromba, palpos e antenas de um pardo bastante escuro, as ultimas com baze ocracea e pubecencia clara ; olhos de côr vermelha um pouco pardacenta ; o resto da cabeça com fundo castanho, um pouco avermelhado, e pruina esbranquiçada, sendo os pêlos escuros ; na fronte e no clipeo ha numerozas escamulas lineares de dourado palido.

Escudo com fundo e revestimento como na fronte e no clipeo ; as escamulas não invadem uma linha mediana, bastante larga e formam pequenos grupos, não arranjados em estrias distintas. Macroscopicamente a face superior da cabeça e do escudo têm a côr cinzento-amarelada e o tomento é finamente granulado no escudo. As escamulas de comprimento medio tornam-se mais compridas na parte posterior e transversais no escutelo. Este ultimo é saliente com fundo igual ao do escudo e de pêlos escuros na marjem posterior. As pleuras e o esterno têm a côr chocolate lijeiramente avermelhada e brilho esbranquiçado.

Abdome canelado e fortemente anelado, pardo ou enegrecido ; em cima com pêlos esparsos, grossos e escuros ; nos meus exemplares, geralmente, muito cheio de sangue.

Azas iriantes em vermelho e verde, a baze e as nervuras grossas ocraceos até pardacentos. Halteres com toda a haste parda e o capitulo de amarelo palido.

Pernas de ocraceo escuro, mais ou menos enfuscados ou enegrecidos ; os pés de diante inteiramente pretos, os do meio e de traz com o metatarso em parte branco-amarelo, no primeiro cazo correspondendo á cerca de dois terços e no segundo á metade ; no pé de traz a baze do tarso vizinho mostra a mesma côr, pelo resto os pés dos pares posteriores são pretos. Nas pernas não ha escamas largas mas apenas formas de tranzição, que, nas partes claras, são niveas e, nas partes mais escuras, de amarelo

18. S. pruinosum n. sp.

Allgemeinfärbung schwärzlich, Grösse ca. 3 mm. (Fig. 42).

Rüssel, Palpen und Antennen ziemlich dunkel braun, letztere mit ockergelber Basis und heller Pubescenz ; Augen bräunlich rot, Rest des Kopfes leicht rötlich braun und weisslich bereift, aber mit dunklen Haaren ; auf Stirne und Clypeus zahlreiche schmale lineäre Schüppchen von heller Goldfarbe.

Scutum wie Stirne und Clypeus gefärbt und beschuppt ; die Schüppchen lassen eine ziemlich breite mediane Linie frei und bilden im Uebrigen kleine Gruppen, aber keine deutlichen Reihen. Makroskopisch erscheint die Oberseite von Kopf und Brust graugelb bereift, letztere deutlich feinkörnig. Nach hinten zu werden die mässig langen Schüppchen deutlich länger und liegen am Schildchen quer. Letzteres ist vorspringend und am Rande mit dunklen Haaren besetzt, sein Grund wie am Scutum beschaffen. Pleuren, Sternum und Metanotum sind leicht rötlich chokoladenbraun und weisslich schimmernd.

Abdomen stark quergefaltet und geriefelt, braun oder schwärzlich, oben mit zerstreuten, dichten und dunklen Haaren, bei meinem Exemplaren meist stark mit Blut gefüllt.

Flügel grün und rot irisierend. Basis und dickere Adern ockergelb bis bräunlich. Halteren mit ganz braunem Stiele und blassgelbem Köpfchen.

Beine dunkel ockergelb, mehr oder meniger gebräunt oder geschwärzt ; vorderster Fuss ganz schwarz, am mittleren der Metatarsus vom oberen Ende an zu ca. zwei Dritteln, am letzten nur in der oberen Hälfte weissgelb ; am hintersten Fusse ist auch die Basis des nächsten Tarsus so gefärbt, der Rest der Füsse ist schwarz. Es existieren an den Beinen keine breiten Schüppchen, sondern nur Uebergangsformen, die an den hellen Teilen schneeweiss, an den braunen blassgelb sind. Die Krallen haben einen deutlichen Zahn und eine vorspringende Ecke,

palido. As unhas têm um dente distinto e um angulo saliente, podendo simular um segundo dente. O ultimo metatarso tem uma palheta curta, mas distinta; o tarso vizinho é bastante curto, com incizão distinta.

Pela côr castanho-avermelhada esta especie se aproxima um pouco do *S. rubrithorax*, pelo tomento e a forte anelação do *S. orbitale*, podendo todavia ser discriminada pelos carateres descritos, não obstante ser tambem de tamanho e estatura similhante.

Um empregado do Instituto apanhou muitas femeas no Rio das Velhas perto de Lassance. Parecem preferir os cavalos.

Larvas e pupas foram encontradas no Rio das Velhas; as primeiras não têm nada de carateristico, as ultimas são encontradas principalmente em pedras e têm um cazulo muito fino e de tipo comun, como tambem a pupa, na qual não achei tricomas. O numero de tubos branquiais de cada lado é de 18, pelo menos (ás vezes 20); são dificeis de contar por serem quazi paralelos e em consequencia d'isso são superpostos e em parte escondidos; são distintamente anelados, bastante curtos, munidos de ponta subconica e de grossura aproximadamente igual. Nacem de bifurcações simples, pela maior parte, situadas perto da baze. Distinguem-se facilmente do *S. hirticosta* pelo calibre maior e mais homojeneo das ramificações, sendo tambem o comprimento dos apendices branquiais muito menor em relação ao da pupa. (Fig. 38, 41).

19. S. simplicicolor n. sp.

Côr geral alaranjado e pardo; comprimento 2,5-3 mm.

O fundo da cabeça pardo, um tanto avermelhado e com brilho cinzento, sem escamas mas com muitos pêlos bastante curtos, de côr muito escura mas com brilho dourado; tromba parda, palpos tambem, porém um pouco avermelhados, principalmente na baze, o ultimo articulo bastante curto; antenas avermelhadas na baze em

die wie ein zweiter Zahn aussehen kann. Der letzte Metatarsus hat eine deutliche, aber kurze Palette, der nächste Tarsus ist ziemlich kurz und hat eine deutliche Incisur.

Durch die braunrötliche Färbung nähert sich die Art dem *S. rubrithorax*, durch das Tomentum und die starke Ringelung dem *orbitale*; doch ist sie trotz ähnlicher Grösse und Statur durch die angegebenen Charaktere ohne Schwierigkeit zu unterscheiden.

Es wurden von einem Institutsdiener zahlreiche weibliche Exemplare am Rio das Velhas bei Lassance gefangen; sie scheinen die Pferde zu bevorzugen.

Larven und Puppen wurden im Rio das Velhas gefunden; erstere haben nichts Besonderes, letztere finden sich namentlich an Steinen und haben ein sehr dünnes Gespinnst, das überdies meist mit Algen verfilzt ist. Gespinnst und Puppe haben die gewöhnliche Form, an letzterer wurden keine Trichome gefunden. Die Zahl der Respirationsröhren beträgt jederseits wenigstens 18 (manchmal 20); sie sind schwer zu zählen, da sie fast parallel laufen und in Folge dessen über einander liegen; sie sind deutlich geringelt, ziemlich kurz und nahezu gleichmässig dick, mit subkonischer Spitze und gehen aus einfachen Bifurkationen hervor, die sich zum grössten Teile ziemlich nahe der Basis befinden. Von dem kleineren *S. hirticosta* unterscheiden sie sich leicht durch das gleichmässigere und weitere Kaliber der Aeste, wie auch der ganze Anhang im Vergleich zu der Puppe viel kürzer ist. (Fig. 38, 41).

19. S. simplicicolor n sp.

Allgemeinfärbung ockergelb, in Orange und Braun übergehend. Länge 2,5—3 mm.

Der Grund des Kopfes braun, ins Rötliche spielend, ohne Schuppen, aber mit vielen Härchen von dunkler Farbe mit goldenen Schimmer; Rüssel braun, Palpen ebenso, aber mehr rötlich, besonders an der Basis, ihr letzter Abschnitt ziemlich kurz; Antennen an der Basis in wechselnder Ausdehnung rötlich, der Rest braun mit

extensão variavel, o resto pardo com pubecencia clara ; olhos pretos no inseto seco.

Metanoto a olho nú de alaranjado vivo, mais amarelo nas marjens laterais e em algumas faxas lonjitudinais pouco distintas ; tomento muito fraco de pêlos curtos e escassos, irregularmente dispostos e de côr escura, quando vistos de cima ; o escutelo, a rejião vizinha do escudo e o metanotum pardacentos, com brilho claro, pouco intenso.

Abdome pardo-escuro (mesmo em jejúm), com as marjens posteriores dos segmentos bastante claros, distintamente canelados e com muitos pêlos miudos de côr escura.

Pernas na sua totalidade ocraceas, com brilho dourado, principalmente na face inferior, sendo um tanto velado por numerozos pêlos miudos de côr escura ; o apice das tibias anteriores e a ultima, toda, assim como os pés, mais ou menos infuscados ; a palheta do ultimo metatarso distinta, o tarso visinho bastante comprido e com incizura distinta ; as unhas com dente pequeno.

Azas : ocraceas na baze e nas nervuras mais grossas, estas ultimas com brilho dourado mas com os espinhos e cilios escuros ; halteres de côr ocracea clara, podendo tornar-se acinzentada ou pardacenta, principalmente no capitulo.

Nesta especie não ha escamas petaloides, mas grande numero de pequenos pêlos bem escuros, podendo as vezes mostrar um brilho dourado. Distinguem-se tambem pela falta de côr branca nas pernas.

O macho tirado da pupa tem a parte superior dos olhos vermelha e com facetas largas e as unhas trifidas.

A larva é bastante grande e tem manchas verde-negras. O cazulo, formado de seda bastante grossa e escura, tem um vestibulo curto com abertura circular ; os tubos branquiais de cada lado consistem de cinco troncos principais, bifurcando-se perto da baze, de modo a formar vinte galhos, aumentando em tamanho de dentro para fora, sendo as mais internas muito curtas.

heller Pubescenz ; Auge nach dem Trocknen schwarz.

Metanotum lebhaft orangerot, an den Seitenrändern und einigen undeutlichen Striemen mehr gelb ; das spärliche Toment besteht aus kurzen Härchen, die, von oben gesehen, dunkel erscheinen ; das Scutellum, der anstossende Teil des Scutums und das Metanotum bräunlich mit schwachem hellerem Schimmer.

Abdomen schon vor der Blutaufnahme dunkelbraun, aber die Hinterränder der Segmente ziemlich hell, deutlich geriefelt und mit zahlreichen dunkeln Härchen besetzt.

Beine im Ganzen ockerfarben, aber— besonders an de Unterseite — mit goldenem Glanze, der durch zahlreiche dunkle Härchen etwas verdeckt wird ; Ende der vorderen, sowie die ganzen Hinterschienen und Füsse mehr oder weniger gebräunt ; Palette am hintersten Metatarsus deutlich ; der nächste Tarsus ziemlich lang mit deutlicher Einkerbung ; die Krallen mit kleinem Zahne.

Flügel an der Basis und den grösseren Adern ockergelb, letztere mit goldenem Schimmer, aber dunklen Haaren und Dornen ; Halteren von hellem Ockergelb, welches besonders am Kapitulum in Grau oder Bräunlich übergehen kann.

Bei dieser Art finden sich keine petaloiden Schüppchen, aber eine grosse Zahl von dunklen Härchen, welche jedoch stellenweise hellen Schimmer zeigen. Sie unterscheidet sich auch durch den Mangel der weissen Farbe an den Beinen. Bei dem aus der Puppe herauspräparierten Männchen ist der obere grossfazettierte Teil des Auges rot und die Krallen sind dreizähnig

Die Larve ist ziemlich gross und hat schwarzgrüne Flecken. Das aus ziemlich grober und dunkler Seide bestehende Gespinnst hat einen kurzen Vorbau mit kreisrunder Oeffnung. Die Respirationsanhänge der Puppe haben je fünf Hauptstämme, welche sich in der Nähe der Basis wiederholt gabeln, so dass 20 Aeste gebildet werden, welche nach aussen zu an Grösse zunehmen, während die Innersten ganz kurz sind. Dei Trichome sind verzweigt.

Os tricomas são ramificados. Foram encontradas em folhas secas em alguns igarapés da mesma rejião onde se colecionaram as imajens. (Fig. 37, 43).

Na ocazião de uma vizita, feita pelo Dr. Oswaldo Cruz á estrada de ferro Madeira-Mamoré, foram apanhadas muitas femeas adultas em varios pontos desta linha em construção. Atacam o homem sendo encontrados frequentemente cheios de sangue.

A especie se distingue pela côr do tomento e pela falta de escamas piliformes brancas nas pernas, tanto do *S. rubrithorax* Lutz como do *perflavum* Roubaud.

20. S. minusculum n. sp. (?=amazonicum Goeldi).

Côr geral preta; tamanho, cerca de 1—1 1/4 mm.

Antenas pretas com pubecencia clara, apenas o articulo bazal pardo-ocraceo; tromba preta; palpos escuros, o segundo articulo fuziforme. Fronte, clipeo e occiput com fundo preto e induto granulozo de forte brilho prateado ou nacarado, com escamas piliformes claras e pêlos mais escuros.

Torax em cima com tres faxas lonjitudinais (uma mediana inteira e duas laterais um pouco abreviadas em frente), cujo fundo aparece preto aveludado; entre estas e as marjens laterais e posterior e n'uma linha em frente das faxas laterais o fundo é mais claro, finamente granulado, com brilho nacarado muito intenso, si a luz fôr favoravel e o exemplar bem conservado; dos dous lados da linha mediana e bem perto da marjem anterior existe uma mancha triangular com apice virado para traz que, vista de frente, parece preta e de traz, branca; as faxas laterais têm a forma um tanto irregular; a faxa mediana é alargada no meio e arredondada nas extremidades; a pleura e o esterno são pretos, com brilho claro; sobre o escudo ha escamas pilifor-

Die Puppen fanden sich in einigen Wasserläufen derselben Gegend, wo die Imagines gefunden wurden, und zwar an ins Wasser gefallenen, dürren Blättern. (Fig 37, 43).

Bei Gelegenheit eines Besuches, den Dr. Oswaldo Cruz bei der Madeira-Mamoré-bahn machte, wurden ziemlich viele arwachsene Weibchen an verschiedenen Stellen der im Bau begriffenen Linie gesammelt. Sie greifen den Meschen an und waren grossenteils blutgefüllt.

Durch die Farbe des Tomentes und den Mangel weisser Haarschüppchen an den Beinen unterscheidet sich diese Art, sowohl von S. *rubrithorax* Lutz, als auch von *perflavum* Roubaud.

20. S. minusculum n. sp. (?=amazonicum Goeldi).

Allgemeinfärbung schwarz. Länge ca. 1—1 1/4 mm.

Antennen durchwegs schwarz mit heller Pubescenz, nur das Basalglied bräunlich gelb; Rüssel schwarz; Palpen dunkel, der zweite Abschnitt spindelförmig. Stirne, Clypeus und Hinterkopf auf schwarzem Grunde mit körnigem Belage von starken Silber- oder Perlmutterglanz, mit helleren Haarschüppchen und dunkleren Haaren.

Thorax oben mit drei breiten Längsbinden (einer medianen und zwei vorne etwas abgekürzten seitlichen), deren Grund sammetschwarz erscheint; zwischen diesen und am Hinter- und Seitenrand, sowie an einer Linie vor den Seitenstreifen, erscheint der Grund heller und feinkörnig mit (bei passender Beleuchtung und guter Konservation sehr lebhaftem) Perlmutterglanz; auf beiden Seiten der mittleren Binde findet sich nahe dem Vorderrande ein, mit der Spitze nach hinten gekehrter, dreieckiger Fleck, der von vorne gesehen schwarz, von hinten gesehen weiss erscheint; der Mittelstriemen ist in der hinteren Hälfte erweitert und an den Enden abgerundet; die Seitenstreifen sind von etwas unregelmässiger Form; Pleura und Sternum schwarz, mit hellem Schimmer; auf dem Scutum stehen blass goldgelbe,

mes comparativamente largas, um tanto curvadas, de dourado palido, tornando-se transversais sobre o escutelo de côr preta.

Abdome preto, muito canelado, com pêlos claros pouco numerozos.

Azas: A baze e as nervuras mais grossas de ocraceo diluido; na raiz uns pêlos de brilho dourado, nas costas pêlos curtos e espinhos bastante distantes entre si; halteres com a haste muito escura e o capitulo amarelo palido.

Pernas em geral pardacentas, o metatarso e os tarsos vizinhos dos ultimos pares com apice escuro; o primeiro com espinhos escuros e uma linha preta, formada por aculeos finos, na face posterior, metatarso do ultimo par com palheta distinta, o tarso vizinho bastante comprido, mas com a incizura dorsal distinta; unhas geralmente sem um dente distinto, apenas com o angulo saliente, mas excecionalmente parece existir; tibia anterior ocracea, a face anterior com escamas branco- nacaradas; tibia do meio ocracea nas duas extremidades, a ultima com a metade bazal clara; nas partes claras ha escamas branco-nacaradas bastante densas, nos outros lugares escamas e pêlos de dourado palido; as escamas são espatuladas com extremidades arredondadas e especialmente conspicuas nos femures, onde prevalece uma forma curta.

As femeas adultas atacam tanto o homem, como os cavalos e parecem muito avidas de sangue. Da maior parte das especies distinguem-se já pelo seu tamanho pequeno; daquelas que são menores e mais parecidas podem facilmente ser discriminadas pelas faxas do escudo; todavia é somente em bons exemplares e com incidencia correta da luz que as manchas nacaradas se acentuam em sua belleza toda. As femeas que serviram de baze á descrição foram colecionadas em março e abril deste anno em Lassance (Minas) pelo Dr. Carlos Chagas.

etwas gebogene und ziemlich breite Haarschüppchen; am schwarzen Scutellum liegen ebensolche quer.

Abdomen schwarz, mit spärlichen hellen Haaren und zahlreichen Längsfalten.

Flügel: Basis und dickere Adern verwaschen ockergelb; an der Wurzel einige goldschimmernde Haare, an der Costa ziemlich von einander abstehende Dornen und kurze Haare; Halteren mit sehr dunklem Stiel und blassgelbem Köpfchen.

Beine im ganzen bräunlich, Metatarsus und benachbarte Tarsen der letzten Paare mit dunkler Spitze, an der Rückseite des ersten dunkle Dornen und eine schwarze aus feinen Stacheln gebildete Linie; letzter Metatarsus mit deutlicher Palette, nächster Tarsus ziemlich lang, aber mit deutlicher dorsaler Incisur; Krallen meist ohne deutlichen Zahn, nur mit vorspringender Ecke (ausnahmsweise scheint ein solcher doch vorzukommen); erste Tibia ockergelb, Vorderfläche mit perlmutterweissen Schuppen; mittlere Tibia an beiden Enden ockergelb, letzte Tibia mit heller oberer Hälfte; an den weissen Stellen finden sich ziemlich dicht stehende, perlmutterweisse Schuppen, anderswo, weniger dicht, blassgoldene Schuppen und Haare; die Schuppen sind spatelförmig mit abgerundetem Ende und besonders deutlich an den Schenkeln, wo eine kurze Form vorwiegt.

Die Mücken greifen sowohl Menschen, als auch Pferde, an und scheinen sehr blutgierig. Schon durch ihre geringe Grösse unterscheiden sie sich von den meisten andern Arten; von kleineren und etwas ähnlichen Species sind sie durch den gestreiften Rückenschild leicht zu unterscheiden, doch sind die auffallenden Perlmutterflecke nur bei guten Exemplaren und richtiger Beleuchtung in ihrer vollen Schönheit zu sehen. Die Exemplare, welche der Beschreibung zu Grunde liegen wurden von Dr. Carlos Chagas im März und April dieses Jahres in Lassance (Minas) gesammelt.

Quando este estudo já se achava terminado recebi do Sr. Dr. Oswaldo Cruz material de simulios do territorio da estrada de ferro Madeira-Mamoré ; este continha, alem de outra especie maior, uma que se parece muito com a descrita acima ; persegue o homem sendo geralmente conhecido pelo nome de « piúm ». Dos dous lugares só examinei material conservado, mas este de Lassance era mais fresco e por isso em melhor estado de conservação, o que significa muito nas especies que tem ornamentos nacarados que podem mudar não somente de brilho, mas tambem de contorno. Não obstante haver aparentemente lijeiras diferenças, as analojias são tantas que me obrigam a acreditar que nos dous cazos se trata da mesma especie. Se já antes desconfiava que talvez a especie fosse identica com a descrita por Goeldi como *Simulium amazonicum*, aumentava a probabilidade pelo fato, de proceder os novos exemplares de rejião mais vizinha e situada em rio do mesmo sistema fluvial. Todavia, a descrição de Goeldi não somente não permitte a diferenciação de especies vizinhas, mas a descrição da tibia anterior (que é dada como preta) parece excluir a identidade. Como porém todas as especies conhecidas que têm as pernas em parte alvacentas e em parte enegrecidas oferecem na face anterior desta tibia ao menos escamas ou pêlos brancos, é possivel tratar-se apenas de um *lapsus calami*. Assim tambem se explicaria por uma omissão que na descrição não se mencionassem as faxas pretas laterais no escudo, em vista da declaração que se poderia falar tambem em cinco estrias lonjitudinais. E' verdade que tambem as faxas curtas de côr escura (que segundo Goeldi seriam semilunares, ajudando a formar a figura de um T virado para a frente) na sua forma não combinam exatamente com os exemplares de Lassance e do Rio Madeira, tambem só aparecem em certa incidencia da luz ; todavia a sua forma pode alterar-se

Erst nach Abscluss dieser Arbiet erhielt ich von Herrn Dr. Oswaldo Cruz Simulienmaterial aus dem Gebiet der Madeira-Mamorébahn, welches neben einer grösseren Art auch eine der obigen sehr ähnliche enthielt, welche dort den Menschen angreift und unter dem Namen « Piúm » bekannt ist. Von beiden besitze ich nur konserviertes Material ; doch war dasjenige von Lassance frischer und daher auch besser konserviert, was gerade bei den hierher gehörigen Arten von Wichtigkeit ist, da mamentlich die Perlmutterflecken nicht nur ihren Glanz, sondern selbst ihre Kontouren verändern können. Trotz anscheinender leichter Differenzen, überwiegen doch die Uebereinstimmungen derart, dass ich annehmen muss, dass es sich in beiden Fällen um dieselbe Art handelt. Lag schon vorher der Gedanke nahe, dass es sich vielleicht um das von Goeldi beschriebene *Simulium amazonicum* handle, so wurde dies um so wahrscheinlicher, als die neuen Exemplare aus einem viel näheren Gebiet stammten, welches mit den Fundorten des *S. amazonicum* direkt durch Flussläufe verbunden ist. Nun ist aber die Goeldi'sche Beschreibung nicht nur zur Unterscheidung von ähnlichen Arten nicht genügend, sondern die Angabe, dass die vordere Tibia schwarz sei, scheint sogar eine Identität auszuschliessen. Da aber alle anderen Arten, deren Beine zum Teile hell und zum Teile dunkel sind, an der Vorderfläche der Tibia wenigstens Haare oder Schuppen von weisser Farbe haben, so darf man annehmen, dass es sich hier nur um einen *lapsus calami* gehandelt habe. Ebenso erklärt es sich wohl durch eine Auslassung, dass im Texte die langen Seitenstriemen von schwarzer Farbe gar nicht erwähnt werden, trotz der Angabe, dass man auch von fünf Längsbinden sprechen könnte. Die kurzen dunklen Striemen welche nach Goeldi halbmondförmig sind und ein nach vorne gerichtetes T bilden helfen, stimmen allerdings in ihrer Form auch nicht ganz mit den Eexemplaren von Lassance und vom Rio Madeira und sind überdies nur in einer bestimmten Beleuchtung sichtbar ; indessen kann sich

em exemplares conservados, sendo que os contornos dos dezenhos nacarados podem tornar-se indistintos ou contratar-se, principalmente em consequencia de humidade ou decomposição de gordura. Do outro lado ha muitas analojias que se estendem tambem ao nome indio de uzo popular e principalmente ao habito de perseguir especialmente o homem, pouco frequente entre as nossas especies. Tenho esperanças de decidir em tempo pouco distante esta questão de identidade.

Os primeiros estados desta especie foram encontrados em igarapés do Rio Madeira, onde, segundo as informações, a correnteza não era muito forte ; achavam-se em folhas muito rezistentes que tinham caido na agua depois de secas. Os cazulos eram frequentemente agrupados e por sua forma chata, larga e curta lembravam *coccidas*, das quais se distinguiam todavia pela chanfradura semilunar anterior que corresponde á abertura do cazulo. São feitos de seda pardacenta, formando fios grossos e escuros. Os apendices branquiais têm uma bifurcação de primeira ordem perto da baze e mais duas de segunda pouco mais acima e quazi na mesma altura. Assim, formam-se de cada lado quatro ramos, muito compridos e finos, com ponta conica que facilmente distinguem esta especie de todas as outras indijenas até hoje conhecidas. Os tricomas são compridos e dicotomos.

A parte anterior da pupa é semeada de granulos escuros finos e pouco numerozos.

Fora das pupas já descritas observei mais algumas de especie incerta, e que por isso rejistrarei por nomes proprios derivados dos seus caracteres. São as seguintes :

1. S. botulibbanchium n. sp. (Fig. 1)

No morro do Observatorio em Petropolis encontrei ao lado de larvas da mes-

die Form am toten Exemplare etwas verändern, indem die Kontouren der Perlmutterflecken undeutlich werden und diese selbst zusammenschrumpfen, was hauptsächlich durch Feucht- oder Oeligwerden zu erfolgen scheint. Dem gegenüber stehen mannigfache Uebereinstimmungen, die sich auch auf die populäre indianische Bezeichnung erstrecken und namentlich die, bei unseren Simulien ziemlich seltene, Gewohnheit, den Menschen besonders stark zu verfolgen. Ich hoffe übrigens, diese Identitätsfrage in nicht zu langer Zeit definitiv entscheiden zu können.

Larven und Puppen dieser Art wurden am Rio Madeira in Wasserläufen gefunden, in denen nach Berichten zu schliessen, keine sehr starke Strömung war. Sie sassen an sehr widerstandsfähigen Blättern, die bereits dürr ins Wasser gefallen waren. Die Gespinnste waren oft zu Gruppen vereinigt und erinnerten durch ihre abgeflachte, breite und kurze Form an Schildläuse, von denen sie sich jedoch durch einen halbmondförmigen, am Vorderende gelegenen und der Oeffnung entsprechenden, Ausschnitt unterscheiden. Sie bestehen aus einer bräunlichen Seide, welche sehr grobe und dunkle Fäden bildet. Die Kiemenanhänge haben eine Bifurkation erster und zwei solche zweiter Ordnung ; letztere liegen etwas weiter oben, nahezu im gleichen Niveau. Auf diese Weise entstehen vier Aeste, welche sehr lang und dünn sind und eine kegelförmige Spitze tragen ; durch diese Kennzeichen unterscheidet sich die Art leicht von allen anderen, die aus unserem Gebiete bekannt geworden sind. Die Trichome sind lang und gabelig, die Puppe ist vorne fein und wenig dicht gekörnt.

Ausser den bereits beschriebenen habe ich noch einige andere Puppen beobachtet, deren Artzugehörigkeit noch unsicher ist und die ich daher unter eignem Namen beschreibe. Es sind dies die Folgenden :

1. S. botulibranchium n. sp. (Fig. 1).

Auf dem Observatoriumsberge in Petropolis fand ich neben den zugehörigen

ma especie pupas muito exquizitas (Fig. 1). que descreverei em seguida. Algumas imagens retiradas do envoltorio pupal não tinham escamas petaloides e pareciam-se assaz com o *S. distinctum*; todavia não eram bastante maduras para ficar a determinação acima de qualquer duvida. Por isso continuarei a rejistrar larva e pupa debaixo do nome provisorio *S. botulibranchium* que se refere á forma carateristica das pupas. As larvas foram encontradas no meio de outras especies e não se salientavam por carateres especiaes. Na pupa o tronco principal de cada aparelho branquial cinde-se em tres ramos, de grossura igual, mas de comprimento diferente; são muito grossos lembrando em sua forma alças intestinais, visto que não correm em linha reta, mas são irregularmente torcidas; aprezentam, em parte, na extremidade livre um prolongamento em forma de dedo. Não oferecem esculturas anulares ou espirais, mas apenas uns aculeos squamiformes minusculos, como, em outras especies, só se observa na baze dos troncos principais. O sistema branquial pode ser considerado como dezenvolvimento extraordinario dos troncos primitivos e secundarios; as demais ramificações faltam ou são apenas reprezentadas por rudimento, o processo digitiforme. — Os tricomas pertencem ao tipo com ramificações multiplas.

2. S. CLAVIBRANCHIUM n. sp. (Fig. 2).

Nesta especie, os apendices branquiais são muito compridos, medindo cerca de 4 mm., quando a pupa e o cazulo apenas aprezentam um comprimento de 3 mm. O tronco principal se divide, perto da baze, por bifurcação dupla em quatro ramos; os dous ventrais permanecem indivizos, o seguinte se bifurca em certa distancia da baze e o ultimo mais alto ainda, sendo dupla a distancia da baze. Assim se formam seis ramos, que se tornam gradualmente mais finos, sendo todavia de grossura igual nas alturas correspondentes e aprezentando a estrutura do costume. Cerca de 1/2 mm. da ponta, que em todos os ramos se acha a mesma distancia da baze

Larven einige sehr eigentümliche Puppen (Fig. 1), die ich weiter unter beschreibe. Aus denselben gewann ich fast reife Imagines, welche mit *S. distinctum* ziemlich gut übereinstimmten; doch waren sie nicht genügend reif, um die Identität über alle Zweifel zu erheben. Ich führe daher die Puppe vorläufig weiter unter dem Namen *S. botulibranchium*, der sich auf die charakteristische Form derselben bezieht. Die Larven, welche neben verschiedenen anderen gefunden wurden, zeigten keine auffallenden Eigentümlichkeiten. Bei der Puppe zerfällt der Hausptstamm der Kiemenanhänge jederseits in drei, gleich weite, aber ungleich lange, Aeste, die sehr dick und wurstförmig sind. Ihr Verlauf ist nicht gerade, sondern unregelmässig gewunden und sie weisen zum Teile am freien Rande einen unregelmässigen, fingerförmigen Fortsatz auf. Dabei zeigen sie weder ring-, noch spiralförmige Skulpturen, sondern nur weit abstehende, äusserst kleine Stachelschüppchen, wie sie sonst wohl an dem basalen Hauptstamme stehen. Man kann sie als eine stärkere Ausbildung von Stamm- und Hauptästen auffassen; die Verzweigungen sind dann weggefallen und nur die fingerförmigen Fortsätze repräsentieren vielleicht ein Rudiment derselben. Die Trichome gehören dem mehrfach verzweigten Typus an.

2. S. CLAVIBRANCHIUM n. sp. (Fig. 2).

Bei dieser Art sind die Respirationsorgane sehr lang; während Puppe und Gespinnst eine Länge von ca. 3 mm. aufweisen, sind jene ca. 4 mm. lang. Der Hauptstamm zerfällt nahe der Basis durch doppelte Bifurkation in vier Aeste; die beiden ventralen bleiben ungeteilt, der folgende gabelt sich in einiger Entfernung von der Basis und der letzte entsprechend noch etwas höher. Es entstehen so sechs Aeste, die sich allmälig verdünnen, aber auf entsprechender Höhe gleich dick sind; sie weisen die gewöhnliche Struktur auf. Ca. 1/2 mm. von der, überall von der Basis gleich weit entfernten, Spitze beginnt an allen Zweigen eine spindelförmige

comum, principia um entumecimento fuziforme que, no meio, tem grossura pelo menos igual á da baze dos ramos principais. Termina em ponte conica, um pouco obtuza e arredondada; a parte terminal é finamente granulada, sem aneis distintos. — Os tricomas têm duas a tres bifurcações e a pupa mostra na parte anterior granulos escuros finos e densamente agrupados; na extremidade posterior ha dous espinhos com as extremidades apenas um pouco curvadas, em forma de gancho. O cazulo é composto de fios de seda muito grossos e escuros.

Larvas e pupas foram encontradas em Petropolis no morro do Observatorio (cerca de 800 m.), na Serra da Bocaina (a cerca de 1200 m.) e tambem na estação de Capivary entre Barra Mansa e Angra dos Reis. Não me foi possivel encontrar nas pupas uma *imago* completamente madura, mas naquellas, que observei, não havia escamas petaloides nas pernas e a extremidade do femur do ultimo par era sempre escura como nas especies *auristriatum* (sempre) e *distinctum* (muitas vezes).

3 S. diversifurcatum n. sp.

Com este nome rejistro outra pupa que se parece bastante com a do *S. clavibranchium* faltando porem os entumecimentos fuziformes terminais dos tubos branquiais. Estes, em numero de seis, são todos muito compridos e ponteagudos na extremidade bastante fina. Nacem de tres bifurcações, situadas em diferentes alturas e, ficando a extremidade a distancia igual da baze do tronco geral, são forçozamente de comprimento dezigual. Do *S. incrustatum*, aliáz bastante similhante, distingue-se facilmente pelos tricomas de ramificações multiplas e a sede mais fina do cazulo. A pele da pupa é finamente granulada na parte anterior.

Os cazulos foram encontrados na Serra da Bocaina, em Capivary e ultimamente perto de Petropolis. Trata-se provavelmente apenas de uma variedade do *subnigrum* tipico, encontrado nos mesmos lugares.

Anschwellung, die in ihrer Mitte der Basis der Hauptstämme an Dicke wenigstens gleichkömmt. Die spindelförmigen Abschnitte sind nicht geringelt, aber fein chagriniert und laufen in eine kegelförmige, etwas abgestumpfte und gerundete Spitze aus. Die Trichome sind mehrfach verzweigt; die Puppenhaut ist zum Teile gekörnt und hat ganz hinten zwei Spitzen, die am Ende nur leicht hakenförmig gebogen sind. Das Gespinnst besteht aus sehr dicken Fäden von dunkler Seide.

Larven und Puppen wurden am Observatoriumberge bei Petropolis (ca. 800 m.) in der Serra da Bocaina (bei fast 1200 m.), später auch noch in Capivary (zwischen Barra Mansa und Angra dos Reis) gesammelt. Ganz reife Imagines konnte ich in meinen Puppen nicht auffinden; die untersuchten zeigten aber an den Beinen keine petaloiden Schüppchen und der hinterste Femur war am Ende schwarz, wie manchmal bei *S. distinctum* und immer bei *S. auristriatum*.

3. S. diversifurcatum n. sp.

Unter diesem Namen verzeichne ich eine andere Puppe, welche derjenigen von *S. clavibranchium* ziemlich gleicht; es fehlen jedoch die spindelförimgen Anschwellungen an den Kiemenröhren. Letztere, sechs an der Zahl, sind ziemlich lang und haben zugespitzte, ziemlich feine Enden. Sie entspringen aus einer primären und drei secundären Bifurkationen, welche auf verschiedener Höhe gelegen sind; da ihre Enden von der Basis des Hauptstammes gleichweit entfernt liegen, sind diese Zweige notwendiger Weise verschieden lang. Von dem sonst ziemlich ähnlichen *S. incrustatum* unterscheidet sich die Puppe leicht durch die mehrteiligen Trichome und die viel feinere Seide des Gespinnstes; ihre Haut ist im vorderen Teile fein granuliert.

Ich fand diese Puppen in der Serra da Bocaina, in Capivary, neuerdings auch bei Petropolis. Sie finden sich neben dem typischen *subnigrum* und sind wohl nur eine Varietät.

4. S. AEQUIFURCATUM n. sp.

Pupa e cazulo de ca. de 2 mm. de comprimento. O tipo de ramificação dos apendices respiratorios parece-se com o do *S. incrustatum*, porém as tres bifurcações estão todas em altura igual, correspondendo ao terço inferior dos tubos branquiais. A pele da pupa na parte anterior é semeada de granulos escuros muito finos; os tricomas são dicotomos. Só tenho um exemplar e não julgo impossivel que se trate apenas de uma variedade do *S. incrustatum*.

5 S. BREVIFURCATUM n. sp. (Fig. 14, 15).

Parecido com *S. pertinax*. Seis tubos branquiais compridos e muito diverjentes, de grossura regular, tornando-se mais finos em direcção á extremidade hemisferica. Nacem de tres bifurcações, situadas perto da baze mas em alturas diferentes. Pele da pupa adiante com granulos um pouco mais escuros e com tricomas dicotomos pouco numerozos. (O *S. pertinax* tem tricomas de ramificação multipla). Achei algumas pupas na SERRA DA BOCAINA, mas nada posso informar a respeito das imagos que se não achavam bastante dezenvolvidas. Talvez seja o *S. auristriatum*.

6. S. INCERTUM n. sp. (=paraguayense Schrottky?).

As larvas e pupas desta especie bastante pequena foram encontradas primeiro em LASSANCE e depois no SALTO GRANDE DO PARANAPANEMA. Ocupavam geralmente fragmento de plantas, principalmente folhas coriaceas que tinham geralmente caido na agua depois de mortas. O cazulo e a pupa têm a forma comum. Os apendices branquiais de cada lado têm oito ramos como no *S. perflavum*, porém em distribuição diferente. Da baze comum nacem tres troncos tendo o interno 2 e o externo 3 ramos, como no *S. perflavum*, porém no medio ha duas bifurcações uma em cima

4. S. AEQUIFURCATUM n. sp.

Puppe und Gespinnst ca. 2 mm. lang. Die Verzweigung der Kiemenröhren ähnlich, wie bei *S. incrustatum*, aber die drei Bifurkationen befinden sich alle auf gleicher Höhe, dem Ende des basalen Drittels der Anhänge entsprechend. Die Puppenhaut ist vorne mit sehr feinen, dunklen Körnchen besät; die Trichome sind zweiteilig. Ich besitze nur ein Exemplar und es ist wohl möglich, dass es sich nur um eine Variation von *S. incrustatum* handelt.

5. S. BREVIFURCATUM n. sp.

Die Puppe (Fig 14 & 15) ist ähnlich derjenigen von *S. pertinax* mit sechs langen Respirationsröhren von gewöhnlicher Dicke, welche starke divergieren und gegen das halbkugelförmige Ende ziemlich dünn werden; dieselben gehen aus drei secundären Bifurkationen hervor, die ziemlich nahe an der Basis in verschiedener Höhe liegen. Puppenhaut vorne etwas dunkler gekörnt, mit spärlichen zweiteiligen Trichomen. (*S. pertinax* hat mehrfach verzweigte Trichome). Ich fand einige Puppen in der SERRA DA BOCAINA, kann aber über die Imago nichts aussagen, da dieselbe nicht genügend entwickelt war; es könnte sich um *S. auristriatum* handeln.

6. S. INCERTUM n. sp. (=paraguayense Schrottky?).

Die Larven und Puppen dieser ziemlich kleinen Species wurden zuerst in LASSANCE und dann am SALTO GRANDE DO PARAPANEMA gefunden. Sie hafteten gewöhnlich an Pflanzenteilen besonders an lederartigen Blättern, die schon trocken ins Wasser gefallen waren. Gespinnst und Puppe haben die gewöhnliche Form. Die Kiemenröhren haben auf jeder Seite acht Zweige, wie bei *S. perflavum*, aber in anderer Verteilung. Der gemeinsamen Basis entspringen drei Stämme; der innerste mit zwei und der äusserste mit drei Zweigen, wie bei *S. perflavum*, aber der mittelste hat auf der gleichen Seite zwei Bifurkationen, eine über der anderen. Die Puppenhaut hat verzweigte Trichome

da outra. A pele tem tricomas ramificados e não é distintamente granulada na parte anterior.

(Por novas pesquizas tornou-se certeza a minha suposição de tratar-se da especie que considerei identica com o *S. paraguayense* de SCHROTTKY).

7. S. HIRTIPUPA n sp.

Desta especie carateristica só tenho uma pupa de LASSANCE (Fig. 21). O seu comprimento é de 2 mm. e tem de cada lado 10 tubos branquiais bastante curtos e muito iguais, de forma igual e munidos de ponta conica comprida e aguda. Nacem em grupos de 6, 2 e 4 de tronco comum e não são anelados, mas finamente granulozos devido a pequenos tuberculos acuminados de forma irregular. Os tricomas são simples, colocados em pequenos discos e extraordinariamente numerozos formando um revestimento de cerdas ao lado do qual tambem se observam espinhos curtos.

8. S. SUBCLAVIBRANCHIUM n. sp.

Cazulo de forma vulgar de cartucho, feito de seda bastante grossa, de 3,5 mm. de comprimento, tendo a pupa 3 e os filamentos branquiais 3,5 mm. A parte anterior do cazulo é semeada de muitos granulos bastante grossos e escuros. Os ramos branquiais são em numero de tres ; têm a parte terminal lijeiramente espessada e terminando em ponta conica igualmente distante da baze comum. Os tricomas são divididos em cinco a dez ramos na parte anterior ; mais para traz na rejião dorsal tornam-se bifidos e finalmente simples. A ramificação dos branquios parece-se com a do *S. clavibranchium* sendo porém as ultimas duas bifurcações mais aproximadas ; distinguem-se todavia pelo entumecimento terminal dos filamentos que no *subclavibranchium* é gradual e pouco acuzado.

und ist im vordersten Teile nicht deutlich granuliert.

(Nachtrag : Durch neue Untersuchungen ist meine Mutmassung, dass es sich um die als *paraguayense Schrottky* aufgefasste Art handle, zur Gewissheit geworden).

7. S. HIRTIPUPA n. sp.

Von dieser charakteristischen Art besitze ich nur eine Puppe aus LASSANCE (Fig. 21). Dieselbe ist nur 2 mm. lang und hat jederseits 10 ziemlich dicke, auffallend kurze und sehr gleichförmige Kiemenröhren mit langer und scharfes, konischer Spitze. Sie zweigen sich zu 6, 2 und 4 von einem gemeinsamen Stamme ab und sind nicht geringelt, sondern nur von kleinen, spitzen und unregelmässig gestalteten Wärzchen sehr fein gekörnt. Die Trichome sind einfach, auf kleinen Scheibchen stehend und ganz auffallend zahlreich, so dass sie am Vorderleibe der Puppe ein borstiges Haarkleid bilden. Daneben kommen auch kurze Dornen vor.

8. S. SUBCLAVIBRANCHIUM n. sp.

Gespinnst von der gewöhnlichen Dütenform aus grober Seide bestehend, 3,5 mm. lang, während die Puppe 3 und die Kiemenröhren 3,5 mm. messen. Der vordere Teil der Puppe ist mit zahlreichen ziemlich dicken und dunklen Körnen besät. Die Zahl der Kiemenäste jederseits beträgt sechs ; sie sind im Endteile leicht erweitert und enden in eine kegelförmige Spitze, die überall von der gemeinsamen Basis gleich weit absteht. Die Trichome sind am vordersten Teile der Puppe fünf-bis zehnästig, weiter nach hinten werden sie gabelig und schliesslich einfach. Die Verzweigung der Kiemen gleicht derjenigen von *S. clavibranchium* doch sind die zwei obersten Bifurkationen einander mehr genähert ; sie unterscheiden sich übrigens durch die terminale Anschwellung der Kiemenäste, welche bei *subclavibranchium* allmälig und unbedeutend ist.

A forma adulta não foi encontrada, provavelmente porque a femea não persegue o homem ; os cazulos foram achados em pequeno numero entre o material colecionado na estrada de ferro MADEIRA-MAMORÉ.

Rio de Janeiro, Fins de Setembro, 1910.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS.

ESTAMPAS 18 - 21.

1. *S. distinctum,* cazulo estendido e pele pupal.
2. *S. clavibranchium,* cazulo estendido e pupa.
3. *S. pertinax,* cazulo e pele pupal.
4. » parte anterior do cazulo e da pupa em perfil.
5, 6. *S. inscrustatum,* pele pupal e pupa.
7. *S. subnigrum,* fragmento da pele pupal com apendice branquial de um lado.
8. *S. diversibranchium,* pupa *in situ,* um pouco achatada.
9. *S. rubrithorax,* cazulo e pele pupal.
10, 11. *S. perflavum,* pupa e pele vazia de pupa ♂.
12. *S. diversifurcatum,* pele pupal, vazia.
13. *S. spinibranchium* (=*subpallidum*?), extremidade anterior da pele pupal aberta.
14, 15. *S. brevifurcatum,* parte anterior de duas pupas nos seus cazulos.
16. *S. hirticosta,* pele pupal.
17. *S. flavopubescens,* parte anterior da pupa no cazulo.
18. *S. flavopubescens,* pupa pequena mostrando um apendice branquial com um dos galhos quebrado.
19, 20. *S. pernigrum,* pedaços de pele pupal mostrando o apendice branquial de um lado
21. *S. hirtipupa,* pupa.
22, 23. *S. paraguayense* (?), pele pupal inteira e fragmento de outra ; em 22 o ramo superior do apendice branquial direito quebrado na baze.
24. *S. pertinax,* cazulo, anomalo por falta de um ramo branquial do lado direito.

Die erwachsene Form wurde nicht bemerkt, wahrscheinlich weil die Weibchen den Menschen nicht angreifen ; die Puppen fanden sich in geringer Zahl zwichen dem Material, welches an der MADEIRA-MAMORÉ-bahn gesammelt wurde.

Rio de Janeiro, Ende September, 1910.

ERKLAERUNG DER FIGUREN.

TAFELN 18 - 21.

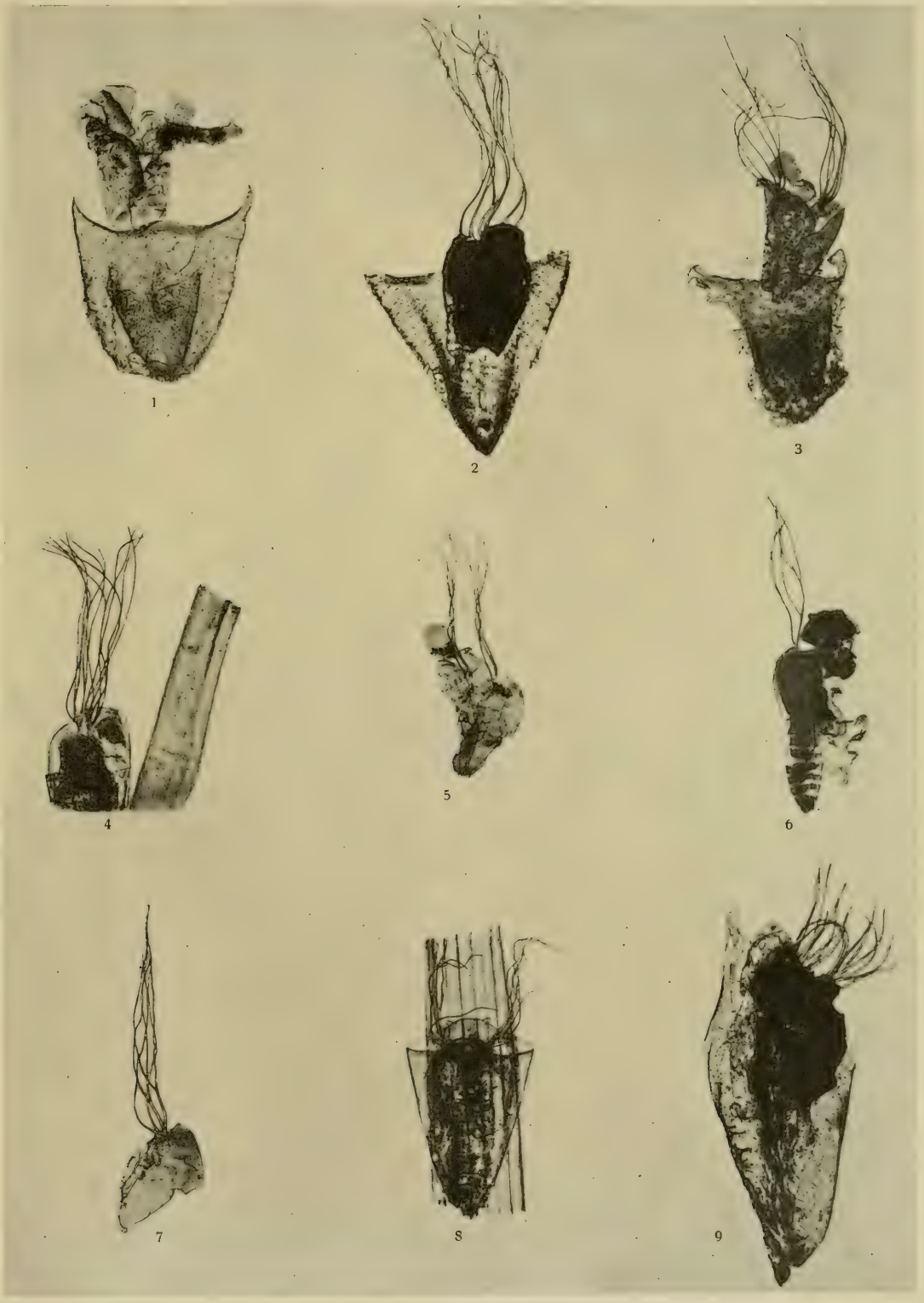
1. *S. distinctum.* Gespinnst und Puppenhaut, ersteres ausgebreitet.
2. *S. clavibranchium,* ausgebreitetes Gespinnst und Puppe.
3. *S. pertinax,* Gespinnst- und Puppenhaut.
4. *S. subnigrum,* Vorderende von Puppe und Gespinnst im Profil.
5, 6. *S. incrustatum,* Puppenhaut und Puppe.
7. *S. subnigrum,* Stück der Puppenhaut mit Kiemenanhang einer Seite.
8. *S. diversibranchium,* Puppe in situ, etwas abgeplattet.
9. *S. rubrithorax,* Gespinnst und Puppenhaut.
10, 11. *S. perflavum,* Puppe und leere Haut von ♂ Puppe.
12. *S. diversifurcatum,* leere Puppenhaut.
13. *S. spinibranchium* (=*subpallidum*?), Vorderende der Puppenhaut, aufgeklappt.
14, 15. *S. brevifurcatum,* Vorderende zweier Puppen im Gespinnst.
16. *S. hirticosta,* Puppenhaut.
17. *S. flavopubescens,* Vorderende der Puppe im Gespinsst.
18. *S. flavopubescens,* kleine Puppe mit Kiemenanhang einer Seite (ein Ast abgebrochen).
19, 20. *S. pernigrum,* Fragmente der Puppenhaut mit je einem Kiemenanhang.
21. *S. hirtipupa,* Puppe.
22, 23. *S. paraguayense* (?), Puppenhaut und Stück einer solchen ; in 22 oberer Ast des rechten Kiemenanhangs an der Wurzel abgebrochen.
24. *S. pertinax.* Anomale Puppe mit Wegfall eines Zweiges der Kiemenröhren rechterseits.

25. *S. rubrithorax*, pupa ♂.
26. » larvas, pupas, peles pupaes e cazulos vazios em ca. de 2/3 de tamanho natural.
27. *S. perflavum* e *subnigrum*. Larvas das duas especies e uma pupa da ultima, fixadas em placa de vidro; de uma cultura. (Ca. de 2/3 de tamanho natural).
28. *S. spec.*; pedaço de palpo com orgão de senso; aumento maior.
29, 30. Femur posterior de duas especies mostrando formas de transição, assim como escamas estreitas e largas. (Aumento maior).
31, 32 & 34. *S. minusculum* (=*amazonicum* GOELDI?), pupas nos cazulos e imagem.
33. *S. subclavibranchium*, parte anterior da pupa.
35, 36. *S. orbitale*, apendizes branquiais da pupa.
37, 43. *S. simplicicolor*, apendice branquial e pele pupal vazia.
38, 41 & 42. *S. pruinosum*, pele pupal vazia, pequena, pupa ♂ e imagem ♀.
39. *S. orbitale*, pupa ♂ no cazulo.
40. » » extremidade posterior da larva em aumento maior.

Onde não houver indicação especial, o aumento é sempre o mesmo, ca. de 8 vezes, permitindo assim comparar as dimensões das especies diferentes.

25. *S. rubrithorax*, ♂ Puppe.
26. » » Larven, Puppen, leere Gespinnste und Puppenhäute (ca. 2/3 nat. Gr.).
27. *S. perflavum* und *subnigrum*. Larven beider Arten und eine Puppe der letzteren an einer Glasplatte fixiert; aus einer Kultur. (Ca. 2/3 nat. Gr.).
28. *S. spec.*, Stück des Palpus mit Sinnesorgan in stärkerer Vergrösserung.
29, 30. Hinterschenkel von zwei verschiedenen Arten, Uebergangsformen, schmale und breite Schüppchen zeigend. (Stärkere Vergrösserung).
31, 32 & 34. *S. minusculum* (=*amazonicum* GOELDI?), Puppen im Gespinnst und Imago.
33. *S. subclavibranchium*, vorderer Teil der Puppe.
35, 36. *S. orbitale*, Kiemenanhänge der Puppe.
37, 43. *S. simplicicolor*, Kiemenanhang und leere Puppenhaut.
38, 41 & 42. *S. pruinosum*, leere Puppenhaut, kleine ♂ Puppe und ♀ Imago.
39. *S. orbitale*, ♂ Puppe im Gespinnst.
40. *S. orbitale*, Hinterende der Larve bei stärkerer Vergrösserung.

Wo nichts besonderes angegeben, sind die Vergrösserungen alle gleich (ca. 8fach) und gestatten daher die Vergleichung der Dimensionen bei den verschiedenen Arten.


1
2
3
4
5
6
7
8
9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

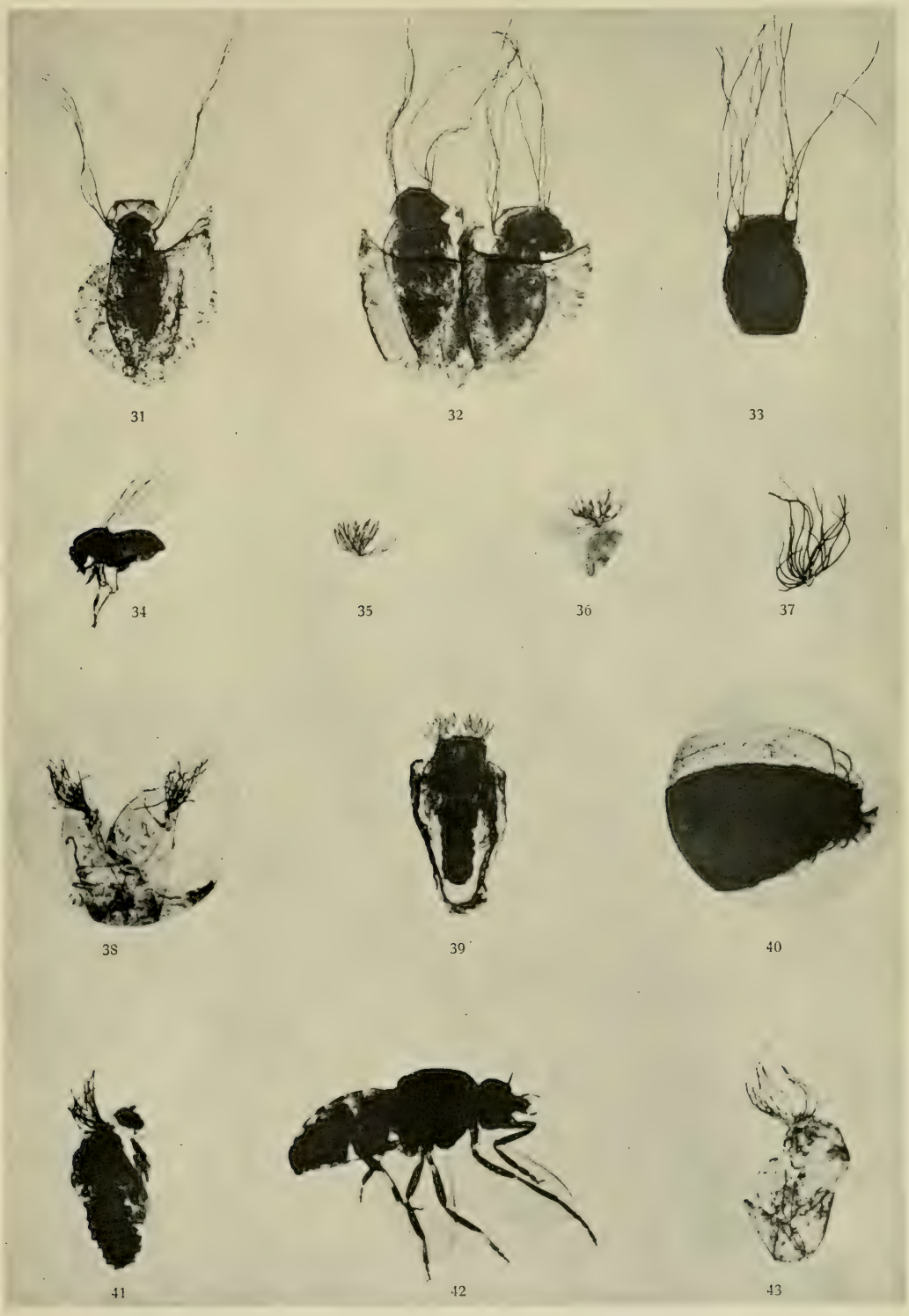
21 22 24 25

23

26 27

28

29 30


31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Chave para a determinação das especies de Simulium descritas por mim, em estado de pupa.

1.	Tubos branquiais salientes e sem circumvoluções ...	2.
	Os mesmos torcidos e parcialmente apostos, com ramos muito largos de comprimento desigual	S. botulibranchium n. sp. (Fig. 1).
2.	Mais de quatro ramos de cada lado	3.
	Quatro ramos de cada lado	S. minusculum n. sp. (Fig. 31, 32). (?=amazonicum Goeldi).
3.	Mais de seis ramos de cada lado	12.
	Seis ramos de cada lado	4.
4.	Os ramos na parte terminal cilindricos ou afinados	6.
	A parte terminal mais grossa e com ponta conica	5.
5.	Entumecimento terminal muito acuzado, fuziforme	S. clavibranchium n. sp. (Fig. 2).
	O mesmo pouco acuzado e gradual	S. subclavibranchium n. sp. (Fig. 33).
6.	Ramificações em parte assaz distantes da baze comum	8.
	Todas ellas pouco distantes da baze comum	7.
7.	Tres bifurcações muito proximas da baze	S. pertinax Kollar (Fig. 3, 4).
	Tres bifurcações um pouco afastadas da baze ...	S. brevifurcatum n. sp. (Fig. 14, 15).
8.	Perto da baze existem quatro troncos de cada lado	11.
	Perto da baze existem apenas tres troncos de cada lado	9.
9.	As bifurcações dos troncos em alturas diferentes	10.
	Todas na mesma altura	S. aequifurcatum n. sp. (?=incrustatum var.).
10.	Duas das bifurcações muito vizinhas; tricomas bifidos	S. incrustatum n. sp. (Fig. 5, 6).
	Todas as bifurcações bastante distantes entre si; tricomas ramificados	S. diversifurcatum n. sp. (Fig. 8).
11.	Troncos de grossura aproximadamente igual	S. subnigrum *n. sp.* (Fig. 7).
	O tronco interno muito mais grosso	S. diversibranchium n. sp. (Fig. 8). (?=infuscatum).
12.	Mais de oito ramos de cada lado	16.
	Oito ramos de cada lado	13.
13.	Cazulo sem atrio; especies de tamanho médio ou pequeno	14.
	Cazulo com atrio franjado; especie grande	S. rubrithorax n. sp. (Fig. 9, 26).
14.	Ramos na baze pouco largos terminando em distancia igual da baze comum	15.
	Ramos em forma de espinho conico terminando diferentes alturas	S. spinibranchium n. sp. (Fig. 13). (=subpallidum?)
15.	As bifurcações na mesma altura; especie media ...	S. perflavum Roubaud (Fig. 10, 11).
	Uma bifurcação acima de outra; especie menor	S. paraguayense Schrottky (Fig. 22, 23).
16.	Mais de 10 ramos de cada lado	17.
	De cada lado 10 ramos curtos; tricomas numerosos, em forma de cerdas	S. hirtipupa n. sp. (Fig. 21).
17.	Mais de 12 ramos de cada lado	18.
	12 ramos de cada lado	S. flavopubescens n. sp. (Fig. 17, 18).
18.	Mais de 14 ramos de cada lado	19.
	14 ramos de cada lado	S. pernigrum n. sp. (Fig. 19, 20).
19.	Bifurcações em diferentes alturas; ramificação em forma de galho de veado	20.
	Bifurcações simples proximos da baze comum, 18 (—20?) ramos quasi cilindricos	S. pruinosum n. sp. (Fig. 22, 23).

20.	Ramos internos do mesmo comprimento do que os outros	21.
	Ramos internos muito mais curtos do que os outros que são assaz compridos	S. simplicicolor n. sp. (Fig. 37, 43).
21.	Apendices branquiais assaz compridos, ultimas ramificações muito finas	S. hirticosta n. sp. (Fig. 16).
	Apendices muito curtos, ramos em forma de espinhos	S. orbitale n. sp. (Fig. 35, 36, 39).

Schluessel zur Bestimmung der von mir beschriebenen Simulium-arten im Puppenzustande.

1.	Kiemenröhren frei vorstehend, ohne Windungen	2.
	Dieselben gewunden und zum Teil anliegend mit sehr weiten, ungleich langen Aesten	S. botulibranchium *n. sp.* (Fig. 1).
2.	Auf jeder Seite mehr wie vier Zweige	3.
	Jederseits vier Zweige	S. minusculum *n. sp.* (Fig. 31, 32). (?=amazonicum Goeldi).
3.	Auf jeder Seite mehr als sechs Zweige	12.
	Jederseits sechs Zweige	4.
4.	Zweige im Endabschnitt cylindrisch oder verengert	6.
	Zweige im Endabschnitt erweitert, mit konischer Spitze	5.
5.	Am Ende der Zweige eine stark abgesetzte spindelförmige Anschwellung	S. clavibranchium *n. sp.* (Fig. 2).
	Das Ende der Zweige unbedeutend und allmälig anschwellend	S. subclavibranchium *n. sp.* (Fig. 33).
6.	Verzweigungen zum Teil von der Basis weit entfernt	8.
	Verzweigungen allen nahe der gemeinschaftlichen Basis	7.
7.	Drei Bifurkationen dicht an der Basis	S. pertinax Kollar (Fig. 3, 4).
	Ebenso, aber von der Basis etwas entfernt	S. brevifurcatum *n. sp.* (Fig. 14, 15).
8.	Nahe der Basis vier Stämme	11.
	Nahe der Basis drei Stämme	9.
9.	Bifurkationen der Stämme nicht auf gleicher Höhe	10.
	Dieselben auf gleicher Höhe	S. aequifurcatum *n. sp.* (?=S. incrustatum var.?)
10.	Zwei Bifurkationen einander sehr nahe; Trichome gabelig	S. incrustatum *n. sp.* (Fig. 5, 6).
	Sämmtliche Gabelungen von einander entfernt; Trichome verzweigt	S. diversifurcatum *n. sp.*
11.	Stämme annähernd gleich dick	S. subnigrum *n. sp.* (Fig. 7).
	Innerster Stamm bedeutend dicker	S. diversibranchium *n. sp.* (Fig. 8). (=S. infuscatum?).
12.	Kiemenröhren jederseits mit mehr als acht Zweigen	16.
	Kiemenröhren jederseits mit acht Zweigen	13.
13.	Gespinnst ohne Vorbau; nicht sehr grosse Arten	14.
	Gespinnst mit gefranztem Vorbau; grosse Art	S. rubrithorax *n. sp.* (Fig. 9, 26).
14.	Zweige an der Basis nicht sehr weit, ihre Enden auf annähernd gleicher Höhe	15.
	Zweige langgestreckt kegelförmig, ihre Enden nicht auf gleicher Höhe	S. spinibranchium *n. sp.* (Fig. 13). (=S. subpallidum?)
15.	Bifurkationen neben einander. Mittelgrosse Art	S. perflavum Roubaud. (Fig. 10, 11).
	Bifurkationen zum Teil übereinander. Kleine Art	S.paraguayense Schrottky (Fig.22,23).
16.	Mehr wie zehn Zweige jederseits	17.
	Zehn kurze Zweige jederseits; Trichome zahlreich, borstig	S. hirtipupa *n. sp.* (Fig. 21).

17.	Mehr wie zwölf Zweige jederseits	18.
	Zwölf Zweige jederseits	S. flavopubescens *n. sp.* (Fig. 17, 18).
18.	Mehr wie vierzehn Zweige jederseits	19.
	Jederseits vierzehn Zweige	S. pernigrum *n. sp.* (Fig. 19, 20).
19.	Bifurkationen in verschiedener Höhe, Verzweigung hirschgeweihartig	20.
	Einfache Bifurkationen nahe der Basis, 18 (—20?) kurze, fast cylindrische Zweige	S. pruinosum *n. sp.* (Fig. 22, 23).
20.	Die innersten Aeste nicht auffällig kürzer	21.
	Die innersten Aeste viel kürzer, als die andern ziemlich langen	S. simplicicolor *n. sp.* (Fig. 37, 43).
21.	Anhänge ziemlich lang, die letzten Zweige sehr dünn	S. hirticosta *n. sp.* (Fig. 16).
	Anhänge sehr kurz, die einzelnen Aeste dick und allmälig zugespitzt, dornartig	S. orbitale *n. sp.* (Fig. 35, 36, 37).

Chave para a determinação das especies de simulium por mim descritas em estado de imago ♀.

1.	Especies multicolores; pernas e halteres nunca totalmente enegrecidas	4.
	Especies unicolores enegrecidas, apenas com pêlos mais claros e azas hialinas	2.
2.	Pêlos claros pouco densos e pouco apreciaveis a olho nú	3.
	Pêlos claros densos e bem apreciaveis a olho nú ...	S. flavopubescens *n. sp.*
3.	Um pouco acima do tamanho medio e completamente preto, encontrado em lugares altos	S. pernigrum *n. sp.*
	Um pouco abaixo do tamanho medio, tirando para chocolate. Em todas as alturas. Não é agressivo	S. hirticosta Lutz.
4.	O fundo do escudo cinzento para preto	10.
	O mesmo de côr	5.
5.	Escudo por dentro das marjens de uma côr só ...	6.
	Escudo amarelo e enegrecido em distribuição variavel	S. varians Lutz.
6.	A côr do escudo é viva	8.
	Côr pouco viva ou um tanto apagada	7.
7.	Escudo de lilaz pardacento ou avermelhado, muitas vezes com faxas lonjitudinais mais escuras. Unhas sem dente. Especie grande	S. scutistriatum Lutz.
	Escudo pardo avermelhado, o tomento muito claro, pruinozo. Tamanho medio	S. pruinosum *n. sp.*
8.	Escudo alaranjado	9.
	Escudo vermelho	S. rubrithorax Lutz.
9.	Marjens laterais do escudo e face anterior das tibias do primeiro par brancas	S. perflavum Roubaud.
	Sem branco. Tomento do escudo fraco e de côr escura	S. simplicicolor *n. sp.*
10.	Escudo sem manchas nacaradas por dentro das marjens	12.
	Por dentro das marjens ha manchas ou faxas nacaradas	11.
11.	Anteriormente e fora da linha mediana duas manchas subtriangulares	S. incrustatum *n. sp.*
	Faxas lonjitudinais de brilho nacarado	S. minusculum *n. sp.* (?=amazonicum Goeldi).

12. Tomento amarelo, as vezes tirando sobre o vermelho e com algum brilho metalico ou difuzo e alvacento ..... 13.
Tomento em feixes, quazi branco, pruinozo ..... S. orbitale *n. sp.*
13. Escamas ou pêlos do tomento formando grupos disposto sem fileiras ..... 16.
Os mesmos dispostoc de modo difuzo ..... 14.
14. Escudo sem tarja clara distincta ..... 15.
Escudo com tarja clara e brilhante. Pernas muito escuras na parte superior ..... S. subnigrum *n. sp.*
15. Escutelo enegrecido ..... 16.
Escutelo pardo-claro; tambem outras partes do corpo mais claras ..... S. subpallidum *n. sp.*
16. Especie grande e grossa com forte brilho de prata, *habitat* em lugares altos ..... S. distinctum *n. sp.*
Especie de lugares baixos, de tamanho medio e com brilho menos acentuado ..... S. pertinax KOLLAR.
17. Halteres pardo-avermelhados pelo menos do lado externo ..... 18.
Halteres amarelos, cinco linhas douradas bem distintos no escutelo, pouco abaixo de tamanho medio ..... S. auristriatum *n. sp.*
18. Halteres pouco escuros ..... 19.
Halteres de pardo-vermelho carregado. Unhas com dente. Tamanho medio ..... S. infuscatum *n. sp.*
19. Unhas inermes. Especie pequena ..... S. exiguum LUTZ.
Unhas com dente. Especie um tanto maior ..... S. paraguayense SCHROTTKY.

Schluessel zur Bestimmung der von mir beschriebenen Simulium-arten im ♀ Imagozustande.

1. Mehrfarbige Arten, bei denen Halteren und Beine nie ganz schwärzlich sind ..... 4.
Einfarbig dunkle Arten, nur die Haare heller und die Flügel farblos ..... 2.
2. Helle Behaarung wenig dicht und makroskopisch kaum sichtbar ..... 3.
Helle Behaarung dicht und schon dem blossem Auge auffallend ..... S. flavopubescens *n. sp.*
3. Etwas über Mittelgrösse, ganz schwarz. Nur in höheren Lagen ..... S. pernigrum *n. sp.*
Etwas unter Mittelgrösse, mehr schokoladebraun; überall verbreitet. Imago nicht agressiv ..... S. hirticosta LUTZ.
4. Grund des Scutums grau bis schwarz ..... 10.
Derselbe farbig ..... 5.
5. Scutum, von den Rändern abgesehen, einfarbig .... 6.
Scutum gelb und schwärzlich, die Zeichnung variiert ..... S. varians LUTZ.
6. Farbe lebhaft ..... 8.
Farbe matt ..... 7.
7. Scutum bräunlich lila oder rötlich, oft mit dunkleren Striemen. Krallen unbewaffnet. Grosse Art ..... S. scutistriatum LUTZ.
Scutum rötlich braun, Tomentum sehr hell, reifartig. Mittelgrosse Art ..... S. pruinosum *n. sp.*
8. Scutum orangefarben ..... 9.
Scutum rot ..... S. rubrithorax LUTZ.
9. Seitenränder des Scutums und Vorderfläche der Tibiae des ersten Paares weiss ..... S. perflavum ROUBAUD.

	Ohne Weiss. Scutum mit schwachem, dunkelfarbigem Tomente	S. hebeticolor *n. sp.*
10.	Scutum im mittleren Teile ohne Perlmutterflecke	12.
	Im mittleren Teile Perlmutterflecke, resp. — binden	11.
11.	Vorne und submedian zwei subtrianguläre Flecken	S. incrustatum *n. sp.*
	Perlmutterglänzende Längsbinden	S. minusculum *n. sp.* (?=amazonicum Goeldi).
12.	Tomentum gelb bis rötlich, etwas metallglänzend, oder weisslich in diffuser Anordnung	13.
	Tomentum in kleinen Büscheln, weisslich und reifartig	S. orbitale *n. sp.*
13.	Haarschüppchen des Tomentes in Gruppen stehend, letztere in Linien geordnet	16.
	Dieselben in diffuser Anordnung	14.
14.	Scutum nicht mit deutlichem hellen Saume	15.
	Der Saum deutlich hell und glänzend. Beine oben stark verdunkelt	S. subnigrum *n. sp.*
15.	Schildchen schwärzlich	16.
	Schildchen hellbraun, auch sonst zum Teile heller	S. subpallidum *n. sp.*
16.	Grosse und dicke Art aus höheren Lagen mit starkem Silberschimmer	S. distinctum *n. sp.*
	Nur mittelgrosse Art aus tieferen Lagen mit matterem Schimmer. Sehr aggressiv	S. pertinax Kollar.
17.	Halteren wenigstens aussen rötlich bis braun	18.
	Halteren gelb, fünf deutliche goldene Längsstreifen auf dem Scutum, fast mittelgross	S. auristriatum *n. sp.*
18.	Halteren nicht sehr stark verdunkelt	19.
	Halteren intensiv braunrot gefärbt. Krallen gezähnt. Mittelgrosse Art	S. infuscatum *n. sp.*
19.	Krallen ungezähnt. Sehr kleine Art.	S. exiguum Lutz.
	Kralien gezähnt. Etwas grössere Art	S. paraguayense Schrottky.

Soro antidizenterico. Metodos de dozajem

PELO

Dr. Arthur Moses.

Ueber Dysenterieserum und seine Wertbestimmung

VON

Dr. Arthur Moses.

Datam de 1903 os primeiros ensaios de soroterapia antidizenterica, que com os estudos de ROSENTHAL, TODD, KRAUS e DOERR sobre a toxina do bacilo de SHIGA-KRUSE tomaram rumo diverso daquelle que lhes tinham imprimido os pioneiros deste capitulo.

Se, por um lado, não ha mais quem hezite em afirmar o efeito curativo do soro, são ainda questões debatidas no capitulo da imunidade dizenterica o processo de melhor produção de toxina, a tecnica para preparo do soro, o metodo de dozajem e a escolha do animal mais sensivel.

Ocupar-nos-emos no prezente trabalho dessas diferentes questões, salientando fatos colhidos na pratica do preparo do imunisoro. Cinco escantilhões de bacilo do tipo SHIGA, proveniente um do Instituto de Hijiene de Berlim, outro do Instituto Pasteur de Paris e trez por nós izolados

Die ersten Versuche einer Serotherapie bei der Dysenterie datieren von 1903 ; doch nahm sie in Folge der Studien von ROSENTHAL, TODD, KRAUS und DOERR über das Toxin des SHIGA-KRUSEschen Bazillus eine, von der durch die Pioniere gegebenen abweichende, Richtung.

Wenn auch auf der einen Seite Niemand zögert, die heilende Wirkung des Serums zuzugeben, so finden sich auf der anderen im Kapitel der Immunisierung bei der Dysenterie noch zahlreiche strittige Punkte, wie die beste Methode für die Gewinnung des Toxines, die Technik der Serumherstellung, die Art der Wertbestimmung und die Wahl der meist empfindlichen Tiere.

In der vorliegenden Arbeit werde ich mich mit diesen Fragen beschäftigen und die, von mir bei Herstellung eines Immunserums festgestellten, Tatsachen hervorheben. Bei meinen Arbeiten wurden fünf Stämme des SHIGAschen Typus verwandt, von denen einer aus dem hygienischen Institute in Berlin, ein anderer aus dem Ins-

no hospicio de alienados serviram aos nossos trabalhos. M, M1 e M2 dezignarão respetivamente os tres ultimos germens.

Entre o caldo Martin pouco alcalino recomendado por Todd e Rosenthal, (1903, 1904) o caldo Dean com quantidade dupla de carne e peptona e o caldo alcalinizado com 0,3 % de carbonato de sodio cristalizado, com ou sem adicionamento de 20 gramas de carbonato de calcio por litro, opinamos pelo ultimo pela regularidade com que obtinhamos toxina de valor quazi constante. Nem sempre pudemos verificar que corriam paralelas a atividade da toxina e a produção da pele no caldo de cultura; assim é que o escantilhão do Instituto Pasteur produzindo, embora, espessa pele no caldo Dean, fornecia toxina mais ativa no caldo Doerr em que era quazi nula a formação de pele.

Cultura de trez semanas mantidas a 37° em caldo Doerr preparado com dupla quantidade de carne e peptona sempre nos forneceu toxina ativa.

Do bacilo M. obtivemos, passajeiramente, a melhor toxina, matando com 0,01cc. coelhos de 1 kilo de pezo. Apoz pequeno numero de transplantações, atenuou-se notavelmente a propriedade toxijena de modo que a excluimos inteiramente da imunização.

Fraca toxina produziam os bacilos M1 e M2 necessitando 1 cc. para matar com regularidade coelhos do pezo mencionado.

De valor egual e constante era a toxina produzida pelo germen do Instituto Pasteur, que, embora antigo no laboratorio, tendo sofrido transplantações multipas matava coelhos quando inoculados com 0,05cc.

Todas as dozajens de toxina foram feitas em coelhos de 1 kilo inoculados na veia safena.

Facil se torna a inoculação nesta veia quando com algodão embebido em

titut Pasteur in Paris und die drei übrigen, von mir isolierten, aus der hiesigen Irrenanstalt staammten. Die lezten drei Stämme bezeichne ich mit M, M_1 und M_2.

Bei der Wahl zwischen der wenig alkalischen Bouillon Martin, wie sie von Todd und Rosenthal (1903, 1904) empfohlen wurde, der Bouillon nach Dean mit doppelter Menge von Fleisch und der gewöhnlichen mit 0,3 % Sodiumkarbonat alkalisch gemachten, mit oder ohne Zusatz von 20 Gramm Kalciumkarbonat per Liter, entschied ich zu Gunsten der letzteren, mit der ich regelmässig Toxin von nahezu gleichem Werte erhielt. Dass die Aktivität des letzteren der Membranbildung in der Kultur entspräche, konnte ich nicht immer konstatieren; so gab der Stamm aus dem Institut Pasteur, obgleich er im Deanschen Medium eine dicke Haut bildete, doch in demjenigen von Doerr, bei äusserst geringer Membranbildung, ein wirksameres Toxin.

Die in letzterem mit der doppelten Menge von Fleisch und Pepton angesetzten und drei Wochen bei 37° gehaltenen Kulturen gaben mir immer ein wirksames Toxin.

Vom Bazillus M. erhielt ich während kurzer Zeit das beste Toxin, von welchem 0,01 ccm. Kaninchen von ein Kilo Gewicht töteten; doch nahm die Toxizität nach einer geringen Zahl von Uebertragungen so bedeutend ab, dass ich diesen Stamm bei der Immunisierung ganz ausschloss. Die Bazillen M_1 und M_2 lieferten ein schwaches Toxin, so dass 1 ccm. nötig waren, um Kaninchen desselben Gewichtes zu töten.

Der Stamm aus dem Institut Pasteur, obwohl schon lange im Laboratorium gehalten und vielfach übergeimpft, produzierte konstant ein gleichwertiges Toxin, welches die Kaninchen in der Dosis von 0,05 ccm. tötete. Die Dosierung des Toxines wurde immer an Kaninchen von 1 Kilo Gewicht durch Einspritzung in die Vena saphena erprobt. Man macht dieselbe ohne Schwierigkeit, wenn man nach

xilol se molha o ponto previamente epilado em que ella passa.

Ao contrario de Dopter, (1903) Shiga *e* Kolle, Heller e de Mestral (1908) que recomendam para estudo da toxina dizenterica o camondongo, preferimos sempre o coelho como o fazem Kraus (1906), Doerr (1906—1907) e Schottelius (1908). A escolha do animal de experiencia foi motivada pela rezistencia, que opunham alguns camondongos á toxina.

Damos em seguida algumas dozajens de toxinas provenientes de escantilhões diversos em que se observa que camondongos havia que rezistiam a dozes de toxina sensivelmente mais altas que a reclamada para matar coelhos.

Escantilhão do Instituto Pasteur de Paris :

Coelho	1.	0,5 cc	de toxina	† em 1½ dia.
»	2.	0,25	»	»	† » 2 dias.
»	3.	0,1	»	»	Paralizia total em 1½ dia, † » 2 dias.
»	4.	0,05	»	»	† » 1½ dia.
»	5.	0,025	»	»	Paralizia em 3 dias. † em 4 dias.
»	6.	0,01	»	»	sobrevive.

Escantilhão M.

Coelho	1.	0,5 cc	de toxina	Paralizia e † em 3 dias.
»	2.	0,25	»	»	Paralizia e † em 2½ dias.
»	3.	0,1	»	»	† » 1½ dia.
»	4.	0,05	»	»	† » 1½ »
»	5.	0,01	»	»	† » 1½ »
»	6.	0,005	»	»	sobrevive.

Escantilhão do Instituto de hijiene de Berlim :

Coelho	1.	0,5 cc	de toxina	† em 1½ dia.
»	2.	0,25	»	»	† » 1 »
»	3.	0,1	»	»	† » 1 »
»	4.	0,05	»	»	† » 1 »
»	5.	0,025	»	»	sobrevive.

Entfernung der Haare die Haut über derselben mittelst eines in Xylol getränkten Wattebausches benetzt.

Im Gegensatz zu Dopter (1903), Shiga und Kolle, Heller und De Mestral (1908), welche für das Studium des Dysenterietoxins die Maus empfehlen, ziehe ich mit Kraus (1906), Doerr (1906-1907) und Schottelius (1908) immer das Kaninchen vor. Die Wahl des Tieres wird durch die Resistenz begründet, welche manche Mäuse dem Toxine gegenüber zeigen.

Ich gebe hier einige Dosierungsversuche, welche mit Toxinen verschiedener Stämme angestellt wurden ; man sieht daraus, wie manche Mäuse Toxindosen widerstanden, welche die zur Tötung von Kaninchen nötigen deutlich übertrafen.

Stamm aus dem Institut Pasteur in Paris.

Kaninchen	1.	0,5 ccm	Toxin	† nach 1½ Tagen
»	2.	0,25	»	»	† » 2 »
»	3.	0,1	»	»	nach 1½ Tagen allgemeine Lähmung † nach 2 Tagen
»	4.	0,05	»	»	† » 1½ »
»	5.	0,025	»	»	» 3 » allgemeine Lähmung † nach 4 Tagen
»	6.	0,01	»	»	Ueberlebt.

Stamm M.

Kaninchen	1.	0,5 ccm	Toxin	Lähmung und Tod nach 3 Tagen.
»	2.	0.25	»	»	Lähmung und Tod nach 2½ Tagen.
»	3.	0,1	»	»	† » 1½ »
»	4.	0,05	»	»	† » 1½ »
»	5.	0,01	»	»	† » 1½ »
»	6.	0,005	»	»	Ueberlebt.

Stamm aus dem hygienischen Institute in Berlin.

Kaninchen	1.	0,5 ccm	Toxin	† nach 1½ Tagen.
»	2.	0,25	»	»	† » 1 Tag.
»	3.	0,1	»	»	† » 1 »
»	4.	0,05	»	»	† » 1 »
»	5.	0.025	»	»	Ueberlebt.

Escantilhão M1 :

Coelho	1.	1,0 cc	de toxina	{	Paralizia em 1½ dia † em 2½ dias.
»	2.	0,75	»	»	sobrevive.

Escantilhão M2 :

Coelho	1.	1,0 cc	de toxina	{	Paralezia em 1½ dia † em 2 dias.
»	2.	0,75	»	»	sobrevive.

Escantilhões do Instituto Pasteur :

Camondongo	1.	1,0 cc	de toxina	† em 4 dias.	
»	2.	0,75	»	»	† » 4 »
»	3.	0,5	»	»	sobrevive.
»	4.	0,25	»	»	»
»	5.	0,1	»	»	»

Pelos numeros 39, 41, 42, 43 e 45 indicaremos os cavalos imunizados. Os cavalos 42 e 45 receberam inoculações intravenozas de emulsões de germens vivos e mortos cultivados durante 24 horas em agar ; no cavalo 41 inoculámos por via subcutanea dozes crecentes de toxina partindo de 0,5cc até 500 cc. ; nos cavalos 39 e 43 inoculámos por via intravenoza emulsões de germens vivos e mortos, e por via subcutanea dozes crecentes de toxina.

Variações individuais não permitem em alguns animais continuar a imunização. Serve de exemplo o cavalo 42 que, devido a intensa reação geral e forte perda de pezo, pouco adiantou a nossos estudos.

A reação local foi intensa quer para inoculações de germens quer para as de toxina. Frequentemente observámos infiltrações contendo um liquido serozo esteril e fragmentos de tecido necrozado.

As toxinas provocaram perdas maiores de pezo que as culturas. Estas ultimas produziam quando inoculadas em alta doze (5 tubos de cultura em agar) reação imediata mais intensa. Assistimos, por

Stamm M_1.

Kaninchen	1.	1,0 ccm	Toxin	{	nach 1½ Tagen Lähmung ; † nach 2½ Tagen.
»	2.	0,75	»		Ueberlebt.

Stamm M_2.

Kaninchen	1.	1,0 ccm	Toxin	{	nach 1½ Tagen Lähmung ; † nach 2 Tagen.
»	2.	0,75	»		Ueberlebt.

Stamm aus dem Institut Pasteur :

Maus	1.	1,0 ccm	Toxin	† nach vier Tagen.	
»	2.	0,75	»	† » » »	
»	3.	0,5	»	Ueberlebt.	
»	4.	0,25	»	»	
»	5.	0,1	»	»	

Mit den Nummern 39, 41, 42, 43 und 45 bezeichne ich immunisierte Pferde. 42 und 45 erhielten intravenöse Einspritzungen von lebenden oder abgetöteten Bazillenemulsionen von 24stündigen Agarkulturen ; 41 erhielt subcutan steigende Toxindosen von 0,5 bis 500 ccm. ; 39 und 43 erhielten intravenös Emulsionen von lebenden und toten Bazillen und subcutan steigende Toxinmengen.

Individuelle Eigenschaften verhindern bei einigen Tieren das Fortsetzen der Immunisierung, wie dies z. B. bei Pferd 42 der Fall war, welches sich in Folge intensiver Reaktion und starken Gewichtsverlustes für meine Studien wenig brauchbar zeigte.

Die lokale Reaktion war eine intensive, sei es, dass lebende Bazillen oder nur Toxine eingeführt wurden. Oft beobachtete ich Infiltrationen, welche in einer sterilen serösen Flüssigkeit nekrotische Gewebsfragmente enthielten.

Die Toxine bewirkten stärkere Gewichtsverluste, als die Kulturen, welche dagegen in hoher Dose (fünf Agarkulturen) eine stärkere unmittelbare Reaktion hervorriefen. Ich beobachtete manchmal nach der Einspritzung ein Hinstürzen des Pfer-

vezes, apoz a inoculação, á queda subitanea do cavalo, que se levantava em seguida ao prolongado atrito de fortes escovas molhadas com alcool na rejião espinhal.

Nos soros obtidos por tecnica diversa fizemos comparativamente o ensaio dos diversos processos de dozajem a que se tem recorrido: pesquiza de bacteriolizinas, aglutininas, opsoninas, anticorpos fixadores complemento, neutralização da toxina *in vitro* e efeito curativo.

Shiga e Kruse, julgando trabalhar com soro de propriedade bactericida dozavam pela bacteriolize *in vivo* e *in vitro* o soro que preparavam em cavalo.

Com os estudos sobre toxina ficou definitivamente abandonado este metodo de dozajem, porquanto o alto poder bacteriolitico nem sempre traduz forte ação curativa do soro.

O fenomeno de Pfeiffer estudado em cobaias foi negativo com qualquer dos soros empregados. Do rezultado irregular rejistrado em outra serie de cobaias, em que tomámos por indice a morte do animal conforme recomenda Lentz (1909) concluimos por abandonar inteiramente este metodo de dozajem.

Mais regular é a destruição do germen *in vitro*.

De cavalo normal obtinhamos o complemento e de cavalo imunizado o amboceptor necessarios aos trabalhos. Empregámos sempre a mesma quantidade de germens 1/2.500.000 duma alça de platina cuja capacidade é de 5mg. Em 2 cc. de solução fiziolojica dissociavamos o conteudo em bacilo dizenterico de 2 alças, procurando obter emulsão homojenea; tinhamos assim a diluição A.

Preparavamos a diluição B. juntando a 5 cc. de solução fiziolojica o conteudo em solução A de duas alças. A diluição C era obtida adicionando a 5 cc. de solução

des, welches sich später nach längeren Friktionen der Rückmarkgegend mit in Alkohol getränkten Bürsten wieder erhob.

Bei, durch verschiedene Technik erhaltenen, Serumproben machte ich vergleichsweise Versuche mit den verschiedenen gebräuchlichen Dosierungsmethoden: Bestimmung der Bakteriolysine, Agglutinine, Opsonine, komplementablenkende Antikörper, Neutralisation des Toxines *in vitro* und Heilwirkungen.

Shiga und Kruse, welche mit baktericidem Serum zu arbeiten glaubten, dosierten das erzielte Pferdeserum durch Bakteriolyse *in vivo* und *in vitro*.

Nach den Studien über das Toxin wurde diese Dosierungsmethode definitiv verlassen, da ein hoher bakteriolytischer Wert nicht immer einer starken Heilwirkung des Serums entspricht.

Der Pfeiffersche Versuch gab beim Meerschweinchen ein negatives Resultat, welche Serumprobe auch verwendet wurde. In Folge der unregelmässigen Resultate bei einer anderen Reihe von Meerschweinchen, in welcher ich nach der Empfehlung von Lentz (1909) den Tod des Tieres zum Massstab nahm, entschloss ich mich, diese Dosierungsmethode vollständig zu verlassen.

Die Abtötung der Bazillen *in vitro* giebt ein regelmässigeres Resultat.

Von einem normalen Pferde gewann ich das Komplement und von einem immunisierten den Amboceptor, deren ich für meine Arbeiten bedurfte. Ich verwandte stets dieselbe Bazillenzahl, den 2500000ten Teil einer Platinöse mit einer Kapazität von 5 mg. Indem ich zwei Oesen Dysenteriebazillen in 2 ccm. physiologischer Kochsalzlösung verteilte, bis eine homogene Emulsion entstand, erhielt ich die Verdünnung A.

Die Verdünnung B stellte ich her, indem ich zu 5 ccm. physiologischer Lösung zwei Oesen der Lösung A zusetzte. Lösung C erhielt ich, indem ich zwei Oesen der Lösung B mit 5 ccm. physiologischer Lösung mischte. Von dieser Lösung C

fiziolojica o conteudo em diluição B de duas alças. Cada occ,1 da diluição C reprezenta 1/2.500.000 de alça. Em tubos de ensaio arrolhados com algodão e esterilizados adicionámos 0,1 de soro normal de cavalo, quantidades decrecentes de imunisoro inativado e 0,1 da diluição C e com uma mixtura de caldo peptonado e solução fiziolojica em partes eguais, egualavamos o conteudo dos tubos. Apoz forte ajitação eram os tubos colocados durante 3 horas na estufa regulada a 37°.

Findo este prazo, o conteudo dos tubos era semeado por suspensão em agar fundido com que faziamos placas, que ficavam na estufa 24 horas.

Faziamos na mesma ocazião uma serie de placas em que verificavamos as bacteriolizinas do soro normal de cavalo, a ação do imunisoro inativado sobre o bacilo dizenterico, a quantidade de germens semeados em cada placa e a esterilidade dos soros.

Contavamos as colonias diretamente, quando em pequeno numero e pelo metodo de NEISSER, quando a germinação era copioza.

O rezultado desses ensaios pode avaliar-se pelos quadros seguintes:

	Soro inativado do cavalo 45	Soro normal de cavalo	Bacilo da dizenteria	Numero de colonias em cada placa
	0,1 cc	0,3cc	1/2.500.000	3.600
	0,05	»	de alça	2.400
	0,01	»	de uma	630
	0,005	»	cultura	690
	0,0025	»	de 24 horas	580
	0,001	»	em agar	520
	0,0005	»		720
	0,0001	»		800
Testemunhas	—	»	»	3.559
	0,1	—	»	3.758
	—	—	»	3.750
	0,1	—	—	0
	—	0,3	—	0

entspricht 0,1 ccm. dem 2500000ten Teil einer Oese. In sterilen und mit Watte verschlossenen Probirröhrchen setzte ich zu 0,1 ccm. normalen Pferdeserums abnehmende Quantitäten von inaktiviertem Immunserum und 0,1 der Lösung C und brachte den Inhalt der Röhrchen mit gleichen Teilen von physiologischer Lösung und peptonhaltiger Bouillon auf entsprechende Mengen. Nach starkem Umschütteln wurden die Röhrchen auf drei Stunden in den auf 37° regulierten Brutschrank gebracht.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Inhalt der Röhren mit geschmolzenem Agar vermischt und dieser in Schälchen ausgegossen, welche 24 Stunden im Brutschrank blieben. Es wurde gleichzeitig eine Serie von Plattenkulturen hergestellt, durch welche ich die Bakteriolysine des normalen Pferdeserums, die Einwirkung des inaktivierten Immunserums auf den Dysenteriebazillus, die Anzahl der in jeder Schale ausgesäten Keime und die Sterilität der Sera kontrollierte.

Waren die Kolonien in geringer Zahl, so wurden sie direkt gezählt traten sie sehr zahlreich auf, so kam die Methode von NEISSER zur Verwendung.

Die Resultate dieser Versuche lassen sich aus den Tabellen 1, 2 und 3 ersehen.

	Inaktiviertes Serum von Pferd 45.	Norm. Pferdeserum.	Dysenteriebazillen.	Zahl der Kolonien auf jeder Platte.
	0,1 ccm	0,3 ccm	1	3.600
	0,05	»	2.500.000	2.400
	0,01	»		630
	0,005	»	Oese einer	690
	0,0025	»	24 st.	580
	0,001	»	Agar-kultur	520
	0,0005	»		720
	0,0001	»		800
Kontrollversuche	—	»	»	3.559
	0,1	—	»	3.758
	—	—	»	3.750
	0,1	—	—	0
	—	0,3	—	0

Soro inativado do cavalo 43	Soro de cavalo normal	Bacilo da dizenteria	Numero de colonias em cada placa
0,5 cc	0,3 cc	1/2.500.000	2.600
0,1	»	de alça	850
0,05	»	de uma	700
0,01	»	cultura	520
0,005	»	de 24 horas	500
0,0025	»	em agar	530
0,001	»		510
0,0005	»		480
0,0001	»		410
Testemunhas —	»	»	2.730
Testemunhas 0,1	—	»	3.725
Testemunhas —	—	»	3.720
Testemunhas 0,1	—	—	0
Testemunhas —	0,3	—	0

Inaktiviertes Serum von Pferde 43.	Norm. Pferdeserum.	Dysenteriebazillen.	Zahl der Kolonien auf jeder Platte.
0,5 ccm	0,3 ccm	1	2.600
0,1	»	2.500.000	850
0,05	»		700
0,01	»	Oese einer	520
0,005	»	24 st.	500
0,0025	»	Agar-kultur	530
0,001	»		510
0,0005	»		480
0,0001	»		410
Kontrollversuche —	»	»	2.730
Kontrollversuche 0,1	—	»	3.725
Kontrollversuche —	—	»	3.720
Kontrollversuche 0,1	—	—	0
Kontrollversuche —	0,3	—	0

Soro inativado do cavalo 41	Soro de cavalo normal	Bacilo da dizenteria	Numero de colonias em cada placa
0,5 cc	0,3 cc	1/2.500.000	1 600
0,3	»	de alça	640
0,1	»	de uma	450
0,05	»	cultura	2.000
0,01	»	de 24 horas	2.520
0,005	»	em agar	3.000
0,0025	»		3.800
0,001	»		3.700
0,0005	»		3.750
0,0001	»		3.900
Testemunhas —	»	»	3.600
Testemunhas 0,1	—	»	3 800
Testemunhas —	—	»	4.000
Testemunhas 0,1	—	—	—
Testemunhas —	0,3	—	—

Inaktiviertes Serum von Pferde 41.	Norm. Pferdeserum.	Dysenteriebazillen.	Zahl der Kolonien auf jeder Platte.
0,5 ccm	0,3 ccm	1	1.600
0,3	»	2 500.000	640
0,1	»		450
0,05	»	Oese einer	2.000
0,01	»	24 st.	2.520
0,005	»	Agar-kultur	3.000
0,0025	»		3.800
0,001	»		3.700
0,0005	»		3.750
0,0001	»		3.900
Kontrollversuche —	»	»	3.600
Kontrollversuche 0,1	—	»	3.800
Kontrollversuche —	—	»	4.000
Kontrollversuche 0,1	—	—	0
Kontrollversuche —	0,3	—	0

São os soros microbianos que tem mais alto titulo de aglutinação, sendo bem fraco o poder aglutinante dos soros antitoxicos e mixtos. Verificámos como KOLLE, HELLER e DE MESTRAL que a inoculação de germens vivos é mais eficaz do que a de germens destruidos pelo calor. Melhor que o cavalo, presta-se o coelho á obtenção de soro antidizenterico de alto poder aglutinante.

Den grössten Agglutinationswert findet man beim antibazillären Serum, während bei den antitoxischen und gemischten das Agglutinationsvermögen nur gering ist. In Uebereinstimmung mit KOLLE, HELLER und DE MESTRAL beobachtete ich, dass die Einführung lebender Bazillen wirksamer ist, als diejenige von durch Hitze abgetöteten Kulturen. Besser als das Pferd eignet sich das Kaninchen zur Erzielung eines antidysenterischen Serums von hohem Agglutinationswert.

SORO	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
Cavalo 39.....	++	++	++	++	+	±	0	0
» 41.....	++	++	+	±	0	0	0	0
» 43.....	++	++	+	+	±	0	0	0
» 45.....	++	++	++	++	++	++	+	±

SERUM	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
Pferd 39	++	++	++	++	+	±	0	0
» 41	++	++	+	±	0	0	0	0
» 43	++	++	+	+	±	0	0	0
» 45	++	++	++	++	++	++	+	±

Ruffer e Willmore, (1908) Haendel (1908) e Auché (1908) verificaram as opsoninas do imunisoro para bacilos da dizenteria, sendo que só tira concluzões dessa pesquiza para o efeito curativo do soro, o ultimo dos pesquizadores mencionados.

Seguimos em nossas pesquizas a tecnica de Wright, empregando leucócitos

Ruffer und Willmore (1908), Haendel (1908) und Auché (1908) stellten die Opsonine im Immunserum gegen Dysenteriebazillen fest, aber nur der letzte dieser Forscher zieht aus dieser Untersuchung Schlüsse auf den Heileffekt des Serums.

Bei meiner Untersuchung folgte ich der Technik von Wright, indem ich Pferdeleukozyten, welche durch Centrifu-

de cavalo obtidos por centrifugação e lavajem de globulos com citrato de sodio a 1,5 % em solução fiziolojica a 0,9 % e culturas de 20 horas em agar. Em termostato apropriado a estudos opsonicos regulado a 37° colocavamos durante quinze minutos os tubos capilares, contendo partes iguais de leucócitos, soro e emulsão de germens.

Pela tionina fenicada de Borrel e pelo liquido de Giemsa córavamos as laminas a examinar.

Da contajem dos germens fagocitados por 100 leucócitos em prezença do soro normal e dos diversos imunisoros, tirámos a media para cada leucócito.

SORO	Numero de germens fagocitados por cada leucócito
Cavalo normal	4.66
» 39	12.75
» 41	8.15
» 43	15
» 45	13

Rejistramos no quadro seguinte o indice opsonico dos diversos soros.

SORO	Indice opsonico
Cavalo 39	2.73
» 41	1.74
» 43	3.24
» 45	2.78

Fixação de complemento foi o assunto em seguida abordado Não concordamos com Kolle, Heller *e* De Mestral, (1908) que assinalam a inferioridade dos extratos sobre as culturas.

gierung und Waschung mit einer 1,5%igen Lösung von Natriumcitrat in 0,9%iger physiologischer Lösung erhalten wurden mit 20stündigen Agarkulturen anwandte. Die Capillarpipetten, welche gleiche Teile Leukozyten, Serum und Bazillenemulsion enthielten, wurden für 15 Minuten in einen, für opsonische Studien geeigneten und auf 37° regulierten, Thermostaten gebracht. Die Objektträgerpräparate wurden vor der Untersuchung mit Karbolthionin nach Borrel und mit Giemsascher Lösung gefärbt.

Aus der Zählung der von 100 Leukozyten phagozytierten Bazillen, in Gegenwart des normalen Serums und verschiedener Immunsera, erhielt ich das Mittel für jeden Leukozyten.

SERUM	Zahl der von jedem Leukozyten phagocytirten Bazillen
Norm. Pferd	4,66
Pferd 39	12,75
» 41	8,15
» 43	15
» 45	13

In nachfolgender Tabelle verzeichne ich den *Index opsonicus* der verschiedenen Sera :

SERUM	Index opsonicus
Pferd 39	2,73
» 41	1,74
» 43	3,24
» 45	2,78

Die Komplementablenkung war das nächste Thema, welches ich studierte. Hier kann ich mit Kolle, Heller und De Mestral (1908), welche die Inferiorität der Extrakte gegenüber den Kulturen

A estes recorremos pela facilidade de preparo e bom rezultado colhido em trabalho anterior.

A emulsão de uma cultura de 24 horas em agar em 10 cc. de solução fiziolojica serviu-nos de antijeno em todos os ensaios.

hervorheben, nicht übereinstimmen. Ich bediente mich der letzteren, wegen der leichten Herstellung und der guten Resultate, welche ich bei einer früheren Arbeit erzielte.

Als Antigen diente mir bei allen Versuchen eine 24stündige Agarkultur in 10 ccm. physiologischer Kochsalzlösung.

2 horas a 37°

1 hora a 37°								
Emulsão de germens	Imunisoro inativado	Soro de cobaia 1/10	Soro de coelho-carneiro 1/1000	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado			
					Cavalo 39	Cavalo 41	Cavalo 43	Cavalo 45
0,01 cc	0,3 cc	1 cc	1 cc	1 cc	—	+	—	—
»	0,1	»	»	»	—	+	—	—
»	0,05	»	»	»	—	+	—	—
»	0,01	»	»	»	+	+++	++	+
»	0,005	»	»	»	+	+++	+++	++
»	0,001	»	»	»	+++	+++	+++	+++
0,02 cc	—	»	»	»	+++	+++	+++	+++
—	0,1	»	»	»	+++	+++	+++	+++

2 Stunden bei 37°

1 Stunde a 37°								
Bazillen-emulsion	Inaktiviertes Immun-serum	Meer-schweinchen-serum 1/10	Kaninchen-hammelblut-serum 1/1000	Hammel-blutkörper-chen 5 %	Resultat			
					Pferd 39	Pferd 41	Pferd 43	Pferd 45
0,01 ccm	0,3 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	—	+	—	—
»	0,1	»	»	»	—	+	—	—
»	0,05	»	»	»	—	+	—	—
»	0,01	»	»	»	+	+++	++	+
«	0,005	»	»	»	+	+++	+++	++
»	0,001	»	»	»	+++	+++	+++	+++
0,02 ccm	—	»	»	»	+++	+++	+++	+++
—	0,1	»	»	»	+++	+++	+++	+++

Diverjimos ainda do Instituto de Berne nos rezultados dos soros antitoxicos, que são, segundo nossas pesquizas, bem pobres em anticorpos de BORDET. Substituimos por toxina as culturas, aproveitando a ocazião de verificar a interessante concepção de NICOLLE e POZERSKI sobre toxinolizinas.

Realmente era assim maior a quantidade de complemento fixado, mas a especificidade da reação não rezistia aos rezultados assinalados com o caldo, empregado para preparo da toxina, filtrado em vela CHAMBERLAND.

Auch in Beziehung auf die antitoxischen Sera kann ich mit dem Institute von Bern nicht übereinstimmen, da sie nach meinen Untersuchungen recht arm an Antikörpern von BORDET sind. Ich ersetze die Kulturen durch Toxine und benutzte die Gelegenheit, um die interessante Auffassung von NICOLLE und POZERSKI in Betreff der Toxinolysine zu kontrollieren.

In der Tat war auf dieser Weise die Menge des abgelenkten Toxines eine grössere, aber die Spezifizität der Reaktion bestätigte sich nicht, wenn Bouillon, wie sie zur Herstellung des Toxines diente, durch eine CHAMBERLAND'sche Kerze filtriert wurde.

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Toxina dizenterica	Soro anti-dizenterico	Caldo DOERR	Soro de cobaia 1/10	Soro de coelho carneiro 1/1000	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,02	0,3	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,2	—	»	»	»	—
»	0,1	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	+
»	0,01	—	»	»	»	++
»	0,005	—	»	»	»	+++
»	0,001	—	»	»	»	+++
0,04	—	—	»	»	»	+++
—	0,1	—	»	»	»	+++
—	0,3	0,02	»	»	»	—
—	0,2	»	»	»	»	—
—	0,1	»	»	»	»	—
—	0,05	»	»	»	»	++
—	0,01	»	»	»	»	+++
—	0,005	»	»	»	»	+++
—	0,001	»	»	»	»	+++
—	—	0,04	»	»	»	+++

2 Stunden bei 37°

1 Stunde bei 37°						
Dysenterie-toxin	Serum-gegen-Dysenterie	Bouillon DOERR	Meer-schweinchen-serum 1/10	Kaninchen-Hammelblut-serum 1/1000	Hammel-blutkörper-chen 5 %	Resultat
0,02	0,3	—	1 ccm	1 ccm	1 ccm	—
»	0,2	—	»	»	»	—
»	0,1	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	+
»	0,01	—	»	»	»	++
»	0,005	—	»	»	»	+++
»	0,001	—	»	»	»	+++
0,04	—	—	»	»	»	+++
—	0,1	—	»	»	»	+++
—	0,3	0,02	»	»	»	—
—	0,2	»	»	»	»	—
—	0,1	»	»	»	»	—
—	0,05	»	»	»	»	++
—	0,01	»	»	»	»	+++
—	0,005	»	»	»	»	+++
—	0,001	»	»	»	»	+++
—	—	0,04	»	»	»	+++

Confirmam estes rezultados ensaios identicos feitos com toxina e antitoxina difterica.

A falta de soro puramente bacteriolitico sem propriedade antitoxica determinou o definitivo abandono das bacteriolizinas como metodo de dozajem aconselhado por SHIGA e KRUSE em trabalhos de 1901 e 1903.

No Instituto soroterapico de Viena KRAUS e DOERR fizeram estudos sistematicos sobre neutralização *in vitro* e poder curativo e preventivo do soro, fazendo inoculações de antitoxina em tempos variaveis apoz a da toxina. Destas experiencias, realizadas todas em coelhos concluem que nenhuma relação existe entre o poder neutralizante e a ação terapeutica e preventiva do soro.

Diesen Resultaten dienen ähnliche, mit Diphtherietoxin angestellte, Versuche zur Bestätigung.

Die Unmöglichkeit, ein rein bakteriolytisches Serum (ohne antitoxische Eigenschaften) zu erhalten, liess mich die von SHIGA und KRUSE in ihren Arbeiten von 1901 und 1903 empfohlenen Bakteriolysine für die Wertbestimmung definitiv verlassen.

KRAUS und DOERR machten im serotherapeutischen Institut in Wien systematische Studien über Neutralisation *in vitro* und praeventive, sowie kurative Wirkung des Serums, indem sie Antitoxin in verschiedenen Intervallen nach dem Toxin einverleibten. Aus diesen, an Kaninchen angestellten, Versuchen schliessen sie, dass zwischen der neutralisierenden Wirkung einerseits, der praventiven und kurativen Eigenschaft andererseits, bei dem Serum keine konstante Beziehung besteht.

Kolle e Heller (1908) pensam explicar esta propozição paradoxal, contraria ao que se verifica dos estudos de Ehrlich sobre antitoxina difterica e de Doenitz sobre antitoxina tetanica, pela extrema sensibilidade do coelho á toxina. Para confirmar os trabalhos de Kraus e Doerr, (1905-1906) pensam os trabalhadores do instituto de Berne, que seria necessario experimentar com grande serie de animais, eliminando assim a sensibilidade individual dos coelhos.

Durante o periodo de imunização dozámos varias vezes em coelhos o soro, experimentando, ora a neutralização *in vitro* durante 15 minutos em banho maria regulado a 37°, ora a inoculação separada de toxina e soro, fazendo preceder ora este ora aquelle de modo a conhecer a ação preventiva e curativa.

Reproduzimos no prezente trabalho os quadros de dozajens realizadas em Janeiro e Junho deste ano, ocazião em que considerámos imunizados os cavalos. Delles facilmente se depreende que não houve grande disparidade nos rezultados das neutralizações *in vitro* e da ação curativa do soro.

Para evitar a introdução na pratica de outro metodo de dozajem exijimos sempre que 0,1 cc. de soro tenha efeito curativo sobre coelhos previamente inoculados com quatro vezes a doze minima mortal de toxina.

Cavalo 43. Toxina 0,2^{cc}=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	1,0 ^{cc}	de soro	sobrevive
»	2.	0,75	» »	† em 8 dias
»	3.	0,5	» »	† em 7 dias
»	4.	0,25	» »	† em 7 dias
»	5.	0,1	» »	† em 11 dias
»	6.	0,2	Toxina	† em 1 dia
»	7.	0,05	» »	† em 1 dia

Neutralização em banho-maria regulado a 37°, durante 15 minutos.

Diesen paradoxen Schluss, der im Gegensatz zu den Folgerungen steht, welche aus den Beobachtungen von Ehrlich über Diphtherie- und Doenitz über Tetanus-Antitoxin hervorgehen, glauben Kolle und Heller (1908) durch die äusserst grosse Empfindichkeit des Kaninchens für das Toxin zu erklären. Die Autoren des Berner Institutes sind der Meinung, dass zur Bestätigung der Arbeiten von Kraus und Doerr (1905-1906) man mit einer grossen Zahl von Tieren experimentiren müsste, um auf diese Weise die individuelle Sensibilität zu eliminieren.

Während der Immunisationsperiode habe ich mehrmals beim Kaninchen den Wert des Serums bestimmt, indem ich entweder die Neutralisation *in vitro*, in einem Wasserbad von 37° während 15 Minuten, oder separate Einführung von Toxin und Serum erprobte, wobei bald das eine, bald das andere Verfahren vorausging, um so die praeventive und kurative Wirkung kennen zu lernen.

Ich gebe hier die Tabellen der, zuerst im Januar und dann im Juni dieses Jahres gemachten, Bestimmungen wieder ; letztere entsprechen den Zeitpunkt, an welchem, meines Erachtens, die Immunisierung der Pferde erreicht war.

Um in die Praxis keine andere Bestimmungsmethode einzuführen, hielt ich daran fest, dass 0,1 ccm. Serum eine Heilwirkung an Kaninchen zeige, welche vorher das Vierfache einer tötlichen Minimaldose erhalten hatten.

Pferd 43. Toxin 0,2 ^{ccm}=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	Ueberlebt
»	2.	0,75	»	† nach 8 Tagen
»	3.	0,5	»	† » 7 »
»	4.	0,25	»	† » 7 »
»	5.	0,1	»	† » 11 »
»	6.	0,2	Toxin	† » 1 »
»	7.	0,05	»	† » 1 »

Neutralisation während 15 Minuten im Wasserbade von 37°.

(Janeiro de 1910)

Cavalo 43. Toxina 0,2cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	1,0 cc	de soro	† em	12 dias
»	2.	0,75	» »	† em	7 dias
»	3.	0,5	» »	† em	7 dias
»	4.	0,25	» »	† em	11 dias
»	5.	0,1	» »	† em	10 dias
»	6.	0,2	» toxina	† em	2 dias
»	7.	0,05	» »	† em	2 dias

Toxina e soro foram mixturados por ocazião da inoculação.

(Janeiro de 1910)

Cavalo 43. Toxina 0,2 cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1	1,0 cc	de soro	† em	12 dias
»	2.	0,75	» »	† em	9 dias
»	3.	0,5	» »	† em	10 dias
»	4.	0,25	» »	† em	10 dias
»	5.	0,1	» »	sobrevive	
»	6.	0,2	» toxina	† em	3 dias
»	7.	0,05	» »	† em	3 dias

Toxina e soro foram inoculados em veias diferentes. Precedeu a inoculação de soro.

(Janeiro de 1910)

Cavalo 43. Toxina 0,2cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	1,0 cc	de soro	† em	8 dias
»	2.	0,75	» »	† em	3 dias
»	3.	0.5	» »	† em	4 dias
»	4.	0,25	» »	† em	8 dias
»	5.	0,1	» »	† em	9 dias

A inoculação da toxina precedeu a do soro.

(Janeiro de 1910)

Cavalo 41. Toxina 0,2cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	1,0 cc	de soro	† em	8 dias
»	2.	0,75	» »	† em	7 dias
»	3.	0,5	» »	† em	6 dias
»	4.	0,25	» »	† em	6 dias
»	5.	0,1	» »	† em	15 dias
»	6.	0,2	» toxina	† em	2 dias
»	7.	0,05	» »	† em	2 dias

Neutralização, durante 15 minutos, em banho-maria regulado a 37°.

(Januar 1910)

Pferd 43. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	† nach	12	Tagen
»	2.	0,75	»	† »	7	»
»	3.	0,5	»	† »	7	»
»	4.	0,25	»	† »	11	»
»	5.	0,1	»	† »	10	»
»	6.	0.2	Toxin	† »	2	»
»	7.	0,05	»	† »	2	»

Toxin und Serum im Moment der Einspritzung vermischt.

(Januar 1910)

Pferd 43. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	† nach	12	Tagen
»	2.	0,75	»	† »	9	»
»	3.	0,5	»	† »	10	»
»	4.	0,25	»	† »	10	»
»	5.	0,1	»	Ueberlebt		
»	6.	0,2	Toxin	† nach	3	Tagen
»	7.	0,05	»	† »	3	»

Toxin und Serum werden in verschiedene Venen eingeführt und zwar letzteres zuerst.

(Januar 1910)

Pferd 43. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	† nach	8	Tagen
»	2.	0,75	»	† »	3	»
»	3.	0,5	»	† »	4	»
»	4.	0,25	»	† »	8	»
»	5.	0,1	»	† »	9	»

Die Einspritzung des Toxines ging derjenigen des Serums voraus.

(Januar 1910)

Pferd 41. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	† nach	8	Tagen
»	2.	0,75	»	† »	7	»
»	3.	0,5	»	† »	6	»
»	4.	0,25	»	† »	6	»
»	5.	0,1	»	† »	15	»
»	6.	0,2	Toxin	† »	2	»
»	7.	0,05	»	† »	2	»

Neutralisation während 15 Minuten im Wasserbad von 37°.

(Janeiro de 1910)

Cavalo 41. Toxina 0.2cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	0,5 cc	de soro	† em	8 dias
»	2	0,3	» »	† em	10 dias
»	3.	0,2	» »	† em	9 dias
»	4.	0,1	» »	† em	8 dias

Toxina e soro foram inoculados em veias diferentes.

(Janeiro de 1910)

Cavalo 45. Toxina 0,2 cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	1,0 cc	de soro	† em	3 dias
»	2.	0,75	» »	† em	2 dias
»	3.	0,5	» »	† em	3 dias
»	4.	0,25	» »	† em	3 dias
»	5.	0,05	» »	† em	2 dias

Neutralização, durante 15 minutos, em banho-maria regulado a 37°.

(Janeiro de 1910)

Cavalo 43. Toxina 0,2 cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	1,0 cc	de soro	sobrevive
»	2.	0,75	» »	»
»	3.	0,5	» »	»
»	4.	0,25	» »	»
»	5.	0,1	» »	»
»	6.	0,05	» »	»
»	7.	0,005	» »	»
»	8.	0,001	» »	† em 7 dias
»	9.	0,2	» toxina	† em 2 dias

Neutralização, durante 15 minutos, em banho-maria regulado a 37°.

(Junho de 1910)

Cavalo 43. Toxina 0.2c c=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	0,5 cc	de soro	sobrevive
»	2.	0,3	» »	»
»	3.	0,2	» »	»
»	4.	0,1	» »	»

Inoculação de toxina na veia safena da perna direita e do soro em identica veia do lado esquerdo.

(Januar 1910)

Pferd 41. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	0,5	Serum	† nach	8 Tagen
»	2.	0,3	»	† »	10 »
»	3.	0,2	»	† »	9 »
»	4.	0,1	»	† »	8 »

Toxin und Serum in verschiedene Venen eingespritzt.

(Januar 1910)

Pferd 45. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	† nach	3 Tagen
»	2.	0,75	»	† »	2 »
»	3.	0,5	»	† »	3 »
»	4.	0,25	»	† »	3 »
»	5.	0,05	»	† »	2 »

Neutralisation während 15 Minuten im Wasserbad von 37°.

(Januar 1910)

Pferd 43. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	Ueberlebt
»	2.	0,75	»	»
»	3.	0,5	»	»
»	4.	0,25	»	»
»	5.	0,1	»	»
»	6.	0,05	»	»
»	7.	0,005	»	»
»	8.	0,001	»	† nach 7 Tagen
»	9.	0,2	Toxin	† » 2 »

Neutralisation während 15 Minuten im Wasserbad von 37°.

(Juni 1910)

Pferd 43. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	0,5	Serum	Ueberlebt
»	2.	0,3	»	»
»	3.	0,2	»	»
»	4.	0,1	»	»

Toxin in die rechte, Serum in die linke vena saphena eingeführt.

(Junho de 1910)

Cavalo 41. Toxina 0,2 cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	1,0 cc	de soro	sobrevive
»	2.	0,75	» »	»
»	3.	0,5	» »	»
»	4.	0,25	» »	† em 7 dias
»	5.	0,1	» »	sobrevive
»	6.	0,05	» »	»
»	7.	0,005	» »	»
»	8.	0,001	» »	»
»	9.	0,2	» toxina	† em 36 horas

Neutralização, durante 15 minutos, em banho-maria regulado a 37°.

(Junho de 1910)

Cavalo 41. Toxina 0,2 cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	0,5 cc	de soro	sobrevive
»	2.	0,3	» »	»
»	3.	0,2	» »	»
»	4.	0,1	» »	»

Toxina e soro foram inoculados em veias diferentes.

(Junho de 1910)

Cavalo 45: Toxina 0,2 cc=4 vezes a doze min. mortal

Coelho	1.	1.0 cc	de soro	sobrevive
»	2.	0,75	» »	† em 8 dias
»	3.	0,5	» »	† em 8 dias
»	4.	0,3	» »	† em 1 dia
»	5.	0.2	» »	† em 2 dias
»	6.	0,1	» »	† em 4 dias

Faltam-nos ainda conhecimentos sobre a ação terapeutica do soro. Em trabalho proximo pretendemos voltar ao assunto.

Manguinhos, Agosto 1910.

(Juni 1910)

Pferd 41. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	Ueberlebt
»	2.	0,75	»	»
»	3	0,5	»	»
»	4.	0,25	»	† nach 7 Tagen
»	5.	0,1	»	Ueberlebt
»	6.	0,05	»	»
»	7.	0,005	»	»
»	8.	0,001	»	»
»	9	0,2	Toxin	† nach 36 Stunden

Neutralisation während 15 Minuten im Wasserbad von 37°.

(Juni 1910)

Pferd 41. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	0,5	Serum	Ueberlebt
»	2.	0,3	»	»
»	3.	0,2	»	»
»	4.	0,1	»	»

Toxin und Serum in verschiedene Venen eingespritzt.

(Juni 1910)

Pferd 45. Toxin 0,2 ccm=vier tödliche Minimaldosen

Kaninchen	1.	1,0	Serum	Ueberlebt
»	2.	0,75	»	† nach 8 Tagen
»	3.	0,5	»	† » 8 »
»	4.	0,3	»	† » 1 »
»	5.	0,2	»	† » 2 »
»	6.	0,1	»	† » 4 »

Es fehlen noch die therapeutischen Resultate bei Dysenteriekranken, auf welche ich in der nächsten Arbeit einzugehen beabsichtige.

Manguinhos, August 1910.

BIBLIOGRAFIA.

AUCHÉ, B. ..... 1908 Pouvoir opsonique du sérum antidysentérique de M. M. VAILLARD et DOPTER et du sérum antidysentérique polyvalent de MM. COYNE—AUCHÉ à l'égard des bacilles dysentériques du type FLEXNER.
Compt. rend. d. l. Soc. de Biol. T. LXIV. N. 16. Pg. 833—835.

COYNE, G. ET AUCHÉ, B. ..... 1908 Action du sérum antidysentérique polyvalent sur les cobayes inoculés dans la cavité péritonéale avec des cultures du bacille dysentérique de FLEXNER.
Compt. rend. d. l. Soc. de Biol. T. LXIV. N. 16. Pg. 829—831.

COYNE, G. ET AUCHÉ, B. ..... 1908 Action comparée du sérum de MM. VAILLARD et DOPTER et du sérum antidysentérique polyvalent sur les cobayes inoculés dans la cavité péritonéale avec des cultures du bacille dysentérique de FLEXNER.
Compt. rend. d. l. Soc. de Biol. T. LXIV. N. 16. Pg. 831—833.

DOERR, R. ..... 1906 Das Dysenterietoxin.
Wien. Klin. Wochenschr. N. 41. Pg. 1.218—1.220.

DOERR, R. ..... 1907 Das Dysenterietoxin. Jena.

DOERR, R. ..... 1908 Dysenterieantitoxin.
In Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung, herausgegeben von R. Kraus und C. Levaditi.

HAENDEL ..... 1908 Zur Differenzierung der Ruhrbakterien mittelst der Aggluti nation, der Komplementablenkung und der bakteriotropen Immunserumwirkung.
Arb. aus dem Kais. Gesundh. Bd. 28, Heft 2, Pg. 358—376.

KOLLE, HELLER UND DE MESTRAL ..... 1908 Untersuchungen über Dysenterietoxine, das Dysenterieserum und seine Wertbestimmung.
Arbeiten aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern etc. Erstes Heft. Pg. 1—50.

KRAUS, R. UND DOERR, R. ..... 1905 Ueber Dysenterieantitoxin.
Wien. klin. Wochenschr. N. 7. Pg. 158—159.

KRAUS, R. UND DOERR, R. ..... 1905 Ueber experimentelle Therapie der Dysenterie.
Wien. klin. Wochenschr. N. 42. Pg. 1.077—1.079.

KRAUS, R. UND DOERR, R. ..... 1906 Das Dysenterieserum.
Wien. klin. Wochenschr. N. 30. Pg. 929—931.

KRUSE ..... 1903 Die Blutserumtherapie bei der Dysenterie.
Deutsche Med. Wochenschr. N. 1. Pg. 68 e N. 3. Pg. 49—51.

LENTZ ..... 1909 In Handbuch der pathogenen Mikroorganismen herausg. von Prof. Dr. W. Kolle und Prof. Dr. A. Wassermann. Zweiter Ergänzungsband. Drittes Heft. Pg. 391—454.

NICOLLE ET POZERSKI ... 1908 Une conception générale des anticorps et de leurs effets.
Ann. de l'Inst. Pasteur. Jan. Pg. 26.

ROSENTHAL, L. ..... 1904 Das Dysenterietoxin (auf natürlichem Wege gewonnen).
Deutsche Med. Wochenschr. N. 7. Pg. 235 e N. 19. Pg. 691—694.

RUFFER, MARC ARMAND, AND WILLMORE, J. GRAHAM ..... 1908 The production of immunity against dysentery toxin.
Brit. Med. Journ. Pg. 1.176.

Schottelius, Ernst. ...	1908	Ueber das Toxin und das Antitoxin der Dysenteriebazillen. Med. Klinik. N. 32. Pg. 1.238—1.244.
Shiga, K.	1901	Studien über die epidemische Dysenterie in Japan unter besonderer Berücksichtigung des Bacillus dysenteriae. Deutsche Med. Wochenschr. N. 43. Pg. 741—744, N. 44. Pg. 765—768 e N. 45. Pg. 783—786.
Shiga, K.	1902	Weitere Studien über den Dysenteriebacillus. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionsk. Bd. XLI. Pg. 355—368.
Todd, Charles	1903	Med. Journ. 5 Dec.
Todd, Charles	1904	On a dysentery toxin and antitoxin. Journal of Hygiene. Vol. IV. Oct. N. 4. Pg. 480—494.
Vaillard et Dopter ...	1903	La dysenterie épidemique. Annales de l'Inst. Pasteur. Juillet. Pg. 462—491.
Vaillard et Dopter ...	1906	Le sérum antidysentérique. Ann. de l'Inst. Pasteur. Mai. Pg. 321—352.

Contribuição para a sistematica helmintolojica brazileira

III

Ancylostomum braziliense n. sp. Parazito dos gatos e cães

PELO

Dr. Gomes de Faria.

(Com Estampa n. 22)

Contribuition towards the classification of brazilian Entozoa

III

Ancylostomum braziliense n. sp. Parasite of cats and dogs

BY

Dr. Gomes de Faria.

(With Plate 22)

Ha cerca de dois anos que cães e gatos sacrificados em Manguinhos e em outros lugares têm sido campo de investigações helmintolojicas, bem cuidadozas, na seção de zoolojia aplicada deste Instituto. Como já desde longa data estes animais têm sido objeto de predileção dos especialistas, estavamos já quazi certos de poder deixar o terreno como bem explorado quando tivemos ensejo de encontrar um ancilostomo que submetido a rigorozo estudo e á comparação com outras especies bem identificadas evidenciou tratar-se de uma nova especie.

Devemos aqui significar ao Prof. A. Railliet de Alfort os nossos mais vivos agradecimentos pelo excellente material de comparação que nos enviou, constituido por exemplares de *Uncinaria stenocephala* Railliet e *Uncinaria criniformis* Goeze.

Material: O material que serviu para esta descrição provem de varios gatos (*Felis domestica L*) capturados em um dos

For about two years long all cats and dogs killed at Manguinhos, as well as in other points of the city have been carefully examined in the zoological department at our institute.

As these animals have since long been a favorite of many an helminthologist we were quite surprised to find an ancylostoma, which, thoroughly studied and compared with others already described, was found to be a new species.

I wish to express my warmest thanks to Prof. Railliet at Alfort for the *Uncinaria stenocephala* Railliet and *U. criniformis* Goeze, received.

Source of material: From several cats (*Felis Domestica*) and a dog (*Canis familiaris*) from the poor quarters of the city we obtained sufficient material for our description.

The cats had, on an average, a dozen parasites everyone, and no symptom or

bairros pobres da cidade e de um cão (*Canis familiaris L.*) proveniente do mesmo local.

Os gatos eram em geral pouco infetados, aprezentando na media apenas uma duzia de parazitos, e não aprezentavam sintomas ou lezões de molestia que pudessem ser atribuidas ao parazito.

O unico cão em que este foi encontrado, mostrava-se em vida extraordinariamente emagrecido e anemiado, com diarrea sanguinolenta.

A autopsia revelou, além das lezões proprias ás anemias, fócos de supuração no figado e pulmão. O intestino delgado continha uma centena de parazitos constituidos 1/3 pelo *Ancylostomum* que vamos descrever e o resto pelo conhecido *Ancylostomum caninum* Ercolani. No correr destas pesquizas tivemos ocazião uma unica vez, de encontrar o pequeno trematodeo bem descrito por Looss (1889) *Ascocotyle minuta* Looss dos cãis e gatos do Cairo e Alexandria e ainda em *Ardea cinerea*: couza que aí vai como documento para os interessados em zoogeografia, pois as dimensões e a tipica organização interna permitiram exata determinação.

Como metodo de conservação, empregámos o aconselhado por Looss e que consiste na fixação no alcool a 70 % aquecido a 80°, seguido do clareamento lento e gradual na glicerina. E' para notar, entretanto, que para fins histolojicos o metodo não se nos afigurou ideal tendo por isso sacrificado em grande parte a descrição anatomica, que farei pouco adiante em traços largos quanto bastem para mostrar a diagnoze especifica da nova especie.

Ancylostomum braziliense n. sp.

Dimensõis: As dimensõis que aqui damos, foram tomadas em exemplares fixados no alcool e depois clareados em glicerina. Esse tratamento modifica um pouco as dimensõis porém acreditamos que os efeitos do alcool e da glicerina, que são contrarios, se compensem. As femeas têm em media 8,5 mm. de comprimento, $0^{mm},35$ de

damage determined by the parasite was to be found.

The only dog with this parasite we had occasion to examine was extremely thin, anemiated and had bloody diarrhea.

The post mortem examination showed not only damages caused by anemia but suppuration in liver and lungs.

About a hundred worms were found in the small intestine. One third of these were ankylostomes of the species described in the present article and two were of *Ancylostomum caninum* Ercolani.

Only once during our researches, we found the small trematode, *Ascocotyle minuta* Looss described in 1899 in cats and dogs of the suburbs of Alexandria and Cairo and in *Ardea cinerea*.

The dimensions and internal organisation lead us to the exact determination of the species. This will probably interest investigators occupied with zoological geography.

We followed Looss and used for preservation 80° hot 70% alcohol and subsequent soaking in glycerine.

For histological purposes this is no ideal method.

The anatomical description was therefore greatly sacrificed.

We will now describe the new species, furnishing enough elements for the specific diagnosis.

Ancylostomum braziliense n. sp.

Dimensions: The specimens measured had been preserved in hot alcohol and subsequently soaked in glycerine.

The worms lengthen in alcohol, but as they contract again slightly in glycerine, no harm has been done in studying the dimensions in these specimens.

largura tomada na porção media do corpo em preparados cobertos com laminula.

Os machos têm em media 7,5 mm. de comprimento e 0,$^{mm}22$ tomados nas mesmas condições.

Côr *in vivo* : Logo quando retirados do animal, são de côr lijeiramente avermelhada como carne lavada e que perdem muito rapidamente em solução salina (0,85 %) ficando então menos transparentes e completamente brancos. Alguns exemplares aprezentam para a extremidade anterior uma mancha linear escura quazi negra, devida á pigmentação da porção anterior do intestino.

Forma : O corpo é linear e pouco rijido como não acontece em outras especies tendo ambas as extremidades afiladas na femea e só a cefalica no macho. O segmento cefalico tambem sofre nesta especie uma torsão lateral porém menos acentuada que em *A. duodenale* e *caninum*, de modo a ser facil rolal-a sobre a laminula e dar-lhe a pozição dezejada o que não acontece nas especies supramencionadas em que a torsão é mais notavel.

Anatomia geral : A pele é fina e rezistente, finamente estriada transversalmente. Musculatura de bom dezenvolvimento. Fortes são os musculos motores da bolsa copuladora dos machos e os cefalo-ezofajianos dos quais a nossa gravura mostra as inserções.

A capsula bucal em virtude da torsão é projetada obliquamente. A marjem ventral é provida de cada lado dum forte e grande dente de forma triangular cujo vertice é voltado para baixo e para traz. No angulo superior e interno destes encontra-se um pequeno dente acessorio. Na marjem dorsal oposta, na linha mediana, vê-se uma incizão quazi semi-circular que é em parte coberta pela pele deixando projetar dois angulos que correspondem aos chamados por alguns escritores « *dentes dorsais* » o que Looss acha improprio por não funcionarem como tais. No fundo da cavidade bucal aparecem ainda dois dentes em forma de lamina triangular curta,

Maximum length is on an average, 8,5 mm. in the female and 7,5 mm. in the male.

Maximum breadth 0,35 mm. in the female and 0,22 mm. in the male.

The maximum breadth was taken in the middle part of the body and from preparations covered with slide glass. Colouring : Living specimens have a pale flesh colour and are semi transparent. In salt solution (0,85%) the reddish colour changes into an opaque white.

Shape alongated and not very rigid as in other species of the same genus. They narrow towards both ends in the female and towards the cephalic extremity in the male.

Towards the cephalic extremity we observed a longitudinal torsion of the body round its axis although not as pronounced as in *A. duodenale* and *caninum* so that preserved specimens can be easily rolled, so as to give them any position desired which is rather difficult in the two species mentioned.

GENERAL ANATOMY.

Skin.—The skin, which envelops the body is thin and resistant with transverse striation.

The musculature is well developed. The muscles of the *bursa* in the male and the cephalo esophageal muscles are particulary developed. The insertion of these muscles are to be seen on our plate.

The mouth is obliquely projected towards the dorsal aspect, owing to the lateral torsion.

The ventral margin of the mouth carries on each side of the middle line a large, strong triangular tooth, the sharp points of which are bent down and backwards.

In the superior and internal angle of these teeth a small accessory tooth is to be seen.

The dorsal opposite edge has on the middle line an almost semi-circular incision, partly covered by the latter. Two

ocupando os dois lados da entrada do ezofago e que são os dentes ventrais internos. São curtos e projetados livremente na cavidade bucal, sendo dificilmente viziveis quando os exemplares têm a boca voltada para cima, aparecendo, entretanto, claramente nos exemplares montados de lado.

As glandulas cefalicas que estão em intima conexão com as faixas laterais ocupam na nossa especie quazi metade do comprimento total do corpo. São duas grandes celulas com grande nucleo ovoide e protoplasma formado de inumeras granulações refrinjentes, podendo ser acompanhadas até a altura da capsula bucal, onde pode ser visto o fino canal excretor que se abre ao nivel da papila lateral da cabeça de modo perfeitamente analogo ao demonstrado por Looss para o *A. duodenale*.

As glandulas ezofajianas tambem são bem apreciaveis, principalmente a dorsal que é bem dezenvolvida e facilmente vista na maioria dos exemplares.

O póro excretor abre-se na face ventral em pequena depressão do corpo um pouco para adiante do anel nervozo e para traz das papilas cervicais. A *ponte* é claramente apreciavel nesta especie com a vezicula excretora tendo anexas as duas glandulas cervicais que são irregularmente fuziformes com nucleos claros. Canais excretores perifericos são claramente perceptiveis nas faxas laterais e extraordinariamente finos.

Os organs internos outros têm em geral a mesma dispozição que no *caninum* e *duodenale*, deixando para trabalho posterior mais minuciozo o estudo comparativo delles onde os dados histolojicos entrem em grande parte.

Assim acontece com o aparelho genital macho no qual, entretanto, a glandula de cimento aprezenta dispozições arborecentes que faltam nas duas especies supramencionadas.

O aparelho espicular é formado de duas espiculas muito longas de côr amarelo-escura, espatuladas na sua extremidade anterior onde se insere o musculo retrator, sendo em toda a extensão finamente estria-

angles project above the latter. These angles have been described as teeth. Looss does not think the name apropriate as they do not function as such.

At the base of the bucal cavity two more short, blade like, triangular teeth, the so called inner ventral teeth are to be seen.

The space between them leads directly into the esophagus. They are short and project freely into the cavity.

When the mouth is turned upwards it is rather difficult to see them. In specimens mounted laterally they appear distinctly.

The cephalic glands are intimately connected with the lateral bands and occupy nearly half of the body length.

The glands are two long big cells with ovoid nucleus and protoplasm of refringent granulation.

One can easily accompany the cells till the mouth capsule, where the delicate excretory duct which opens at the lateral head papillæ in exactly the same way as described by Looss in *A duodenale*, is to be seen.

The esophageal glands are also large, principally the dorsal one which is well developed and easily seen in most all specimens.

The excretory pore opens on the ventral face in a small depression cephalad of the nerve ring and caudad of the cervical papillae.

The *bridge*, with excretory vesicle and cervical glands, is quite visible.

The glands are irregular and clearly observed on the lateral bands. The other internal organs are disposed as in *A. duodenale* and *caninum*.

In a later article we intend to enter into detail comparing *A. braziliense* with *duodenale* and *caninum*.

Histological notes will then play a great part.

The arborescent disposition of the cement gland in the male genital organs has not been observed in the other 2 species.

das em sentido transversal e afinando-se para a ponta até tornar-se em fio extraordinariamente fino onde terminam. As espiculas encontravam-se sempre completamenet retraidas.

O *gubernaculum* ou peça acessoria é tambem de côr amarelado-escura e vizivel na entrada da cloaca de forma um tanto irregular embora comparavel ao de um cabo de punhal. A abertura ano-genital que se faz no chamado cone genital é aqui muito pouco notavel ; nada ha que mereça especial descrição.

Uma papila prebursal é notada em todos os exemplares um pouco antes da expansão que forma a bolsa copuladora.

A bolsa copuladora cuja organização é analoga á das outras especies do genero possue um lobo dorsal e bem nitidamente separado dos lobos laterais. A dispozição é bastante analoga á de *A. caninum* sendo porém o raio dorsal muito mais longo. Os raios laterais são relativamente curtos em relação ao tronco de orijem. Raios ventrais, tão longos como naquella especie. As gravuras da Estampa 22 dispensam maior descrição.

A extremidade posterior da femea é achatada transversalmente para traz do anus e termina em ponta muito fina que faz saliencia fora da cuticula. A abertura anal faz-se em uma depressão do corpo bem na extremidade posterior e lateralmente. Duas papilas caudais são observadas em todos os exemplares, bastante pequenas, percebendo-se uma depressão na pele ao nivel dellas.

A vulva é assinalada por leve depressão ao nivel da exrtemidade mais anterior do terço posterior, vajina muito curta e musculos vulvares de parcas fibras. No mais o aparelho genital femeo tem a mesma organização do das outras especies do genero. Os ovos são elipsoides e foram vistos com 2 a 4 celulas de segmentação munidos de membrana muito fina e medem em media 65 μ de comprimento e 32 μ de largura.

The spicular apparatus consists of two very long dark yellow spicula with a flattened anterior extremity on which the retractor muscles are inserted. The spicula are transversely striated in their whole extension and end in extremely fine points.

The spicula were always completely retracted.

The dark yellow, irregularly shaped *gubernaculum* or « accessory piece » is visible at the aperture of the cloaca.

The anogenital pore opens in the genital cone.

In all specimens a prebursal papilla is to be seen in front of the bursa. In the *bursa*, with general anatomy as in other species, the median lobe is distinctly separated from the lateral lobes.

The disposition resembles greatly that of *A. caninum*.

The dorsal ray is much longer and the lateral rays are relatively short in comparison to the principal trunk. The ventral rays are as long as in *A. caninum*.

The plate 22 dispenses further description. The posterior extremity of the female is compressed transversally behind the anus and ends in a very sharp point, projecting through the skin.

The anal aperture can be seen in a depression on the lateral part of the posterior extremity.

Next to two very small caudal papillœ a small depression of the skin can be seen.

In a small depression, at the anterior extremity of the posterior third, lies the vulva.

The vagina is very short. The vulvar muscles are not developed.

On other points the female genital organs resemble those of the other species of this genus.

The elipsoid ova were seen with two to four segmentation cells, each with a very delicate membrane.

The eggs measure, on an average, 65 μ in length and 32 μ in breadth.

Quanto á pozição sistematica da especie que acabamos de descrever não temos duvida em colocal-a no genero *Ancylostomum*, seguindo para isso a diagnoze dada por Looss (1905) em sua notavel monografia. Depois do majistral informe da questão de propriedade e prioridade dos nomes *Uncinaria* e *Ancylostomum* criou a subfamilia *Ancylostominae* fazendo figurar nestas os trez generos *Ancylostomum*, *Uncinaria* e *Necator*, dando a cada um desses generos carateres fixos com reprezentantes tipos bem conhecidos. Esses dados sistematicos têm sofrido tentativas de modificações de varios autores principalmente de A. Railliet e Henry (1909) que criaram uma tribu *Ankylostomeæ* na qual entra o genero em questão fazendo, porém, passar o *Necator* Stiles para uma outra, *Bunostomeæ* visto as relações deste com *Bunostomum* Railliet. (*Monodontus* Molin) ; voltando ainda a precizar os mesmos dados mais recentemente (1910). Comtudo a definição generica do genero *Ancylostomum* permaneceu fixa até hoje como Looss em 1905 forneceu apezar do acrecimo de mais algumas especies até aquella época não conhecidas.

Quanto ao diagnostico diferencial com as outras especies parazitos dos cãis e gatos domesticos, penso ser bastante facil vistos os carateres anatomicos da especie que descrevemos. Sobretudo as dimensõis e os carateres tirados da capsula bucal tornam bastante facil a identificação. A especie mais comum que parazita cãis e gatos é *A. caninum* Ercolani do qual se distingue pelas dimensõis, pelo numero de dentes ventrais e tambem pela bolsa caudal, devendo comtudo ainda uma vez ser assinalado que as diferenças desta entre as varias especies não são tão evidentes que sejam consideradas elemento seguro para diagnostico diferencial. Railliet (1900), além das formas consideradas como especificamente indeterminaveis e da *Uncinaria stenocephala* Railliet, que fica fóra de discussão por estar em outro genero, não assinala nenhuma especie que possa ser confundida com a que agora acabamos de descrever.

Following the diagnosis given us by Looss in his magnificent monography we have no doubt in including the worm just described in genus *Ancylostomum*. After describing excellently the propriety and prior rights of the names *Ancylostomum* and *Uncinaria* he united the genus : *Ancylostomum*, *Uncinaria* and *Necator* into a subfamily : *Ancylostominæ*.

Of each genus Looss gives us the chief distinctive characters and a well known type species.

Several authors have tried to modify this systematisation.

Railliet and Henry (1909) created a tribe : *Ankylostomeæ* with genus *Ancylostomum*.

Owing to the intimate connection of genus *Necator* Stiles with *Bunostomum* Railliet (*Monodontus* Molin) he included it in tribe *Bunostomeæ*.

In 1910 Railliet returned to the same subject.

The generic name of *Ancylostomum* as given by Looss in 1905 has been mantained. Species then unknown, have been included at a later date.

The dimensions and description of the buccal capsule allow a rather easy differential diagnosis.

The most common parasite of cats and dogs is *Ancylostomum caninum* Ercolani from which our species can be distinguished by the dimensions, number of ventral teeth and caudal *bursa*.

The latter is not a very secure element for a specific diagnosis.

Excepting some specimens, which are specifically undeterminable and *Uncinaria stenocephala* Railliet, which is out of question, as it is classified in another genus Railliet does not speak of any species which could be confounded with the one described.

ALESSANDRINI (1905) em suas « *Uncinariae* » descreveu tambem um *Ancylostomum pluridentatum* ALESS. de um *gato selvajem* do Brazil porém nenhum traço de confuzão aparece se compararmos a capsula bucal provida de uma serie de trez dentes nos bordos laterais.

13 de Setembro de 1910.

EXPLICAÇÃO DAS GRAVURAS.

FIG. 1.

Capsula bucal de *Ancylostomum braziliense*. Ocul. 5 comp.; Obj. 8,5mm Winkler. Camara clara.

FIG. 2.

Bolsa caudal de *Ancylostomum braziliense*. Obj. 8mm. Ocul. I. Zeiss. Camara clara.

ALESSANDRINI (1905) described amongst his « *Uncinariæ* » an *Ancylostomum pluridentatum* ALESSANDRINI from a brazilian wild cat.

Comparing the buccal capsule with a series of 3 teeth on the lateral margin of the buccal capsule we see that there is no reason for confusion.

13 — September — 1910.

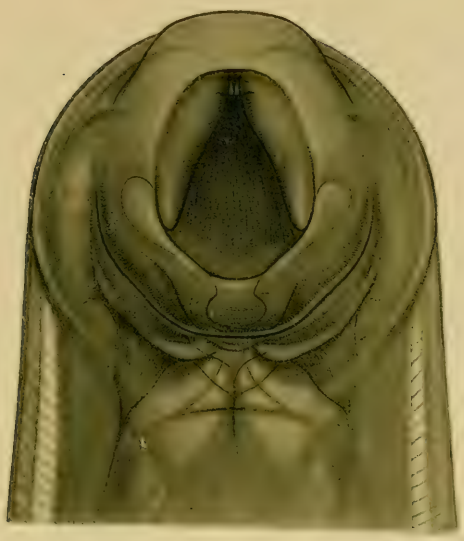
EXPLANATION OF PLATES.

PLATE 1.

Buccal capsule *Ancylostomum braziliense*. Ocul. 5 comp.; Obj. 8,5mm. Winkler.

PLATE 2.

Caudal bursa of *Ancylostomum braziliense*. Obj. 8mm. Ocul. I. Zeiss.



1

2

Castro Silva. del.

BIBLIOGRAFIA.

Alessandrini, G.	1905	Uncinariae parasita etc. Com. f. alla Societá Zool. Italiana. Roma.
Cohn, L.	1899	Uncinaria Perniciosa. V. Linstow in Arch. de Parasitologie. Vol. 2, p. 5.
Leuckart, R.	1876	Die menschlichen Parasiten. Leipzig, Bd. II.
Linstow, von	1887	Compendium der Helminthologie. Hannover.
Linstow, von	1903	« Helminthologische Beobachtungen ». Centralbl. f. Bakt. 1. Abt. Orig., Bd. 35.
Looss	1899	Weitere Beiträge zur Kentniss der Trematoden Fauna Aegyptens, Zoolog. Jahrbücher : Abt. für Systematik, Bd. IX, p. 698.
Looss	1904	« Zum Bau des erwachsenen Ancylostomum duodenale ». Centralbl. f. Bakt. Orig., Bd. 35.
Looss	1905	« The anatomy and life history of Agchilostoma duodenale, Dub. » Translat. by Mat, Bernard ». Records of the Egyptian Government. School of Medicine Cairo. Nat. Print. Department.
Perroncito, E.	1902	I parassiti dell'uomo etc. Milano.
Railliet, A.	1895	Traité de zoologie med. et agricole. Paris.
Railliet, A.	1900	Observation sur les Uncinaires des Canidés et des Félides. Arch. de Parasitologie, vol. II, p. 82.
Railliet, A. & Henry, A.	1909	« Sur la classification des Strongylidae » I, II. Compt. Rend. d. l. Soc. d. Biologie. Tome LXVI, p. 85. Séance 16 janvier.
Railliet, A. & Henry, A.	1909	Sur la classification des Strongylidae. Compt. Rend. d. l. Soc. d. Biologie. Tome LXVI, p. 168. Séance du 30 janvier.
Railliet, A. & Henry, A.	1910	Quelques helminthes nouveaux etc. Bull. d. l. Soc. d. Pathologie Exotique. Tome III, n. 5.
Schneider, A.	1866	Monographie der Nematoden. Berlin.
Stiles, Ch. W.	1902	A new species of hookworm. American Medicine, vol. III, n. 19. May 10.
Stiles, Ch. W.	1903	« Report upon the prevalence of kookwormdisease ». U. S. Dep. of Agriculture. Ann. Report of the Bur. of Animal Industry. Washington.

New York Botanical Garden Library
3 5185 00289 6296